

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-502186

(43)公表日 平成9年(1997)3月4日

(51) Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F I	
A 61 K 39/395	A B C	9284-4C	A 61 K 39/395	A B C D
35/14		9283-4C	35/14	C
35/28		9283-4C	35/28	
39/395		9284-4C	39/395	U

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 73 頁)

(21)出願番号	特願平7-508291
(86) (22)出願日	平成6年(1994)9月2日
(85)翻訳文提出日	平成8年(1996)3月1日
(86)国際出願番号	PCT/US94/09953
(87)国際公開番号	WO95/06481
(87)国際公開日	平成7年(1995)3月9日
(31)優先権主張番号	08/116, 255
(32)優先日	1993年9月2日
(33)優先権主張国	米国(US)
(31)優先権主張番号	08/232, 929
(32)優先日	1994年4月25日
(33)優先権主張国	米国(US)

(71)出願人	トラスティーズ・オブ・ダートマス・カレッジ アメリカ合衆国03755ニュー・ハンプシャー、ハノーバー(番地の表示なし)
(72)発明者	ノエル、ランドルフ・シェイ アメリカ合衆国03745ニュー・ハンプシャー、コーニッシュ、ボックス257、ルーラル・ルート3番
(72)発明者	フォイ、テレサ・エム アメリカ合衆国03756ニュー・ハンプシャー、レバノン、メドウ・ブルック・ビルジ3-13番
(74)代理人	弁理士 青山 葵 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗原特異的なT細胞寛容の誘導方法

(57)【要約】

抗原特異的なT細胞寛容を誘導する方法が開示される。該方法は、T細胞を、(1)該T細胞に抗原を呈示し、接触依存性のヘルパー効クター機能を媒体する該T細胞の表面上の受容体と相互作用するリガンドを有する細胞、および(2)該抗原呈示細胞上の該リガンドと該T細胞上の該受容体との相互作用を抑制する、該T細胞の表面上の該受容体のアンタゴニストと接触させることを含む。好ましい態様において、該T細胞に抗原を呈示する細胞はB細胞であり、接触依存性のヘルパー効クター機能を媒体する該T細胞の表面上の受容体はgp39である。該アンタゴニストは、抗gp39抗体または可溶性のgp39リガンド(たとえば、可溶性のCD40)であるのが好ましい。本発明の方法は、可溶性抗原または同種細胞に対するT細胞寛容を誘導するのに用いることができる。本発明の方法はまた、骨髄移植および他の臓器の移植の場合に寛容を誘導し、および対宿主移植片疾患を抑制するのにも用いることができる。

【特許請求の範囲】

1. 被験者に、

(a) T細胞に抗原を呈示し、接触依存性のヘルパー効果機能を媒体する該T細胞の表面上の受容体と相互作用するリガンドを表面に有する細胞、および

(b) 該リガンドと該受容体との間の相互作用を抑制する、該T細胞の表面上の該受容体のアンタゴニスト

を投与することを特徴とする、抗原特異的なT細胞対応をインビボで誘導する方法。

2. 接触依存性のヘルパー効果機能を媒体する該T細胞の表面上の該受容体がgp39である、請求項1に記載の方法。

3. 該アンタゴニストが抗gp39抗体である請求項2に記載の方法。

4. 該細胞が休止B細胞である請求項1に記載の方法。

5. 該B細胞を投与する前に抗原と接触させる請求項4に記載の方法。

6. 該細胞が同種B細胞である請求項1に記載の方法。

7. 被験者に、

(a) T細胞に抗原を呈示し、該T細胞の表面上のgp39と相互作用するリガンドを表面に有する細胞、および

(b) gp39のアンタゴニスト

を投与することを特徴とする、抗原特異的なT細胞対応をインビボで誘導する方法。

8. 該アンタゴニストが抗gp39抗体である請求項7に記載の方法。

9. 該抗gp39抗体がモノクローナル抗体である請求項8に記載の方法。

10. 該抗gp39抗体が抗ヒトgp39抗体である請求項9に記載の方法。

11. 該抗gp39抗体がモノクローナル抗体24-31である請求項10に記載の方法。

12. 該抗gp39抗体がモノクローナル抗体89-76である請求項10に記載の方法。

13. 該抗 g p 3 9 抗体がキメラモノクローナル抗体である請求項 8 に記載の方法。
14. 該抗 g p 3 9 抗体がヒト化モノクローナル抗体である請求項 8 に記載の方法。
15. 該アンタゴニストが可溶性形態の CD 4 0 である請求項 7 に記載の方法。
16. 該可溶性形態の CD 4 0 が融合タンパク質である請求項 15 に記載の方法。
17. 該細胞が休止 B 細胞である請求項 7 に記載の方法。
18. 該 B 細胞を投与する前に抗原と接触させる請求項 16 に記載の方法。
19. 該抗原がタンパク質である請求項 18 に記載の方法。
20. 該抗原がアレルゲンである請求項 19 に記載の方法。
21. 該タンパク質が自己抗原である請求項 19 に記載の方法。
22. 該細胞が同種 B 細胞である請求項 7 に記載の方法。
23. 該細胞が末梢血である請求項 7 に記載の方法。
24. 該細胞が同種骨髓である請求項 7 に記載の方法。
25. 被験者に、
 - (a) T 細胞に抗原を呈示する B 細胞、
 - (b) 該 B 細胞に付随する抗原、および
 - (c) 抗 g p 3 9 抗体を投与することを特徴とする、抗原特異的な T 細胞寛容をインビボで誘導する方法。
26. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体である請求項 24 に記載の方法。
27. 該抗 g p 3 9 抗体が抗ヒト g p 3 9 抗体である請求項 25 に記載の方法。
28. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 2 4 - 3 1 である請求項 27 に記載の方法。
29. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 8 9 - 7 6 である請求項 27 に

記載の方法。

3 0. 該抗原がタンパク質である請求項 2 5 に記載の方法。

3 1. 被験者に、

- (a) T細胞に抗原を呈示する同種細胞、および
- (b) 抗 g p 3 9 抗体

を投与することを特徴とする、同種細胞に対するT細胞寛容をインビボで誘導する方法。

3 2. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体である請求項 3 1 に記載の方法

◦ 3 3. 該抗 g p 3 9 抗体が抗ヒト g p 3 9 抗体である請求項 3 1 に記載の方法

◦ 3 4. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 2 4 - 3 1 である請求項 3 3 に記載の方法。

3 5. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 8 9 - 7 6 である請求項 3 3 に記載の方法。

3 6. 被験者に、

- (a) 同種骨髓、および
- (b) 抗 g p 3 9 抗体

を投与することを特徴とする、骨髓移植に対するT細胞寛容をインビボで誘導する方法。

3 7. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体である請求項 3 6 に記載の方法

◦ 3 8. 該抗 g p 3 9 抗体が抗ヒト g p 3 9 抗体である請求項 3 7 に記載の方法

◦ 3 9. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 2 4 - 3 1 である請求項 3 8 に記載の方法。

4 0. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 8 9 - 7 6 である請求項 3 8 に記載の方法。

4 1. 被験者に、

- (a) 同種骨髓、および
- (b) 抗 g p 3 9 抗体

を投与することを特徴とする、対宿主移植片疾患を抑制する方法。

4 2. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体である請求項 4 1 に記載の方法

。

4 3. 該抗 g p 3 9 抗体が抗ヒト g p 3 9 抗体である請求項 4 2 に記載の方法

。

4 4. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 2 4 - 3 1 である請求項 4 3 に記載の方法。

4 5. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 8 9 - 7 6 である請求項 4 3 に記載の方法。

4 6. T 細胞を、

(a) 該 T 細胞に抗原を呈示し、該 T 細胞の表面上の g p 3 9 と相互作用するリガンドを表面に有する細胞、および

- (b) g p 3 9 のアンタゴニスト

と接触させることを特徴とする、抗原特異的な T 細胞寛容を誘導する方法。

4 7. 該アンタゴニストが抗 g p 3 9 抗体である請求項 4 6 に記載の方法。

4 8. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体である請求項 4 7 に記載の方法

。

4 9. 該抗 g p 3 9 抗体が抗ヒト g p 3 9 抗体である請求項 4 8 に記載の方法

。

5 0. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 2 4 - 3 1 である請求項 4 9 に記載の方法。

5 1. 該抗 g p 3 9 抗体がモノクローナル抗体 8 9 - 7 6 である請求項 4 9 に記載の方法。

5 2. 該アンタゴニストが可溶性形態の C D 4 0 である請求項 4 6 に記載の方法。

5 3. 該可溶性形態のCD40が融合タンパク質である請求項5 2に記載の方
法。

- 5 4. 該細胞がリンパ細胞である請求項4 7に記載の方法。
- 5 5. 該リンパ細胞が休止B細胞である請求項5 4に記載の方法。
- 5 6. 該抗原がアレルゲンである請求項4 7に記載の方法。
- 5 7. 該抗原が自己抗原である請求項4 7に記載の方法。
- 5 8. 該抗原がアロ抗原である請求項4 7に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

抗原特異的なT細胞寛容の誘導方法

発明の背景

抗原特異的なT細胞の活性化およびクローン拡張 (clonal expansion) を誘導するには、抗原呈示細胞 (APCs) によって提供される2つのシグナルが休止Tリンパ球の表面に送達される必要がある (ジェンキンス (Jenkins, M.) およびシュバルツ (Schwartz, R.) (1987) *J. Exp. Med.* 165, 302~319; ミュラー (Mueller, D. L.) ら (1990) *J. Immunol.* 144, 3701~3709; ウィリアムズ (Williams, I. R.) およびウナヌエ (Unanue, E. R.) (1990) *J. Immunol.* 145, 85~93)。第一のシグナルは免疫応答に特異性を付与するものであり、主要組織適合性複合体 (MHC) と関連して呈示される外来抗原性ペプチドの認識後のT細胞受容体 (TCR) を介して媒体される。第二のシグナルはコスティミュレーション (costimulation) と呼ばれるもので、T細胞を誘導して増殖させ、機能的にする (シュバルツ (1990) *Science* 248, 1349~1356)。コスティミュレーションは抗原特異的でもないしMHCに限定されるものではなく、APCsによって発現される1または2以上の異なる細胞表面分子によって提供されると思われる (ジェンキンスら (1988) *J. Immunol.* 140, 3324~3330; リンスレイ (Linsley, P. S.) ら (1991) *J. Exp. Med.* 173, 721~730; ギミ (Gimmi, C. D.) ら (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6575~6579; ヤング (Young, J. W.) ら (1992) *J. Clin. Invest.* 90, 229~237; クーロバ (Koulova, L.) ら (1991) *J. Exp. Med.* 173, 759~762; ライサー (Reiser, H.) ら (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 271~275; バンーセベンター (van-Seventer, G. A.) ら (1990) *J. Immunol.* 144, 4579~4586; ラサル (LaSalle, J. M.) ら (1991) *J. Immunol.* 147, 774~80; ダスティン (Dustin, M. I.) ら (1989) *J. Exp. Med.* 169, 503; アーミテージ (Armitage, R. J.) ら (1992) *Nature* 357, 80~82; リ

ウ (Liu, Y.) ら (1992) *J. Exp. Med.* 175, 437~445)。T細胞活性化に関与する一つのコスティミュラトリーエン路にはT細胞表面上の分子CD28が関与する。この分子は、B細胞または他のAPCs上のリガンドによって送達されるコスティミュラトリーシグナルを受け取ることができる。CD28のリガンドとしては、B7-1および/またはB7-2などのBリンパ球活性化抗原のB7ファミリーの成員が挙げられる (Freedman, A. S.) ら (1987) *J. Immunol.* 137, 3260~3267; Freedman, G. J. ら (1989) *J. Immunol.* 143, 2714~2722; フリーマンら (1991) *J. Exp. Med.* 174, 625~631; フリーマンら (1993) *Science* 262, 909~911; アズマ (Azuma, M.) ら (1993) *Nature* 366, 76~79; フリーマンら (1993) *J. Exp. Med.* 178, 2185~2192)。B7-1およびB7-2はまた活性化T細胞表面上に存在する他の分子、CTLA4のリガンドでもあるが、コスティミュレーションにおけるCTLA4の役割はわかっていない。

コスティミュラトリーシグナルとともに抗原特異的シグナルがT細胞に送達されるとT細胞が活性化される。T細胞の活性化にはT細胞の増殖およびサイトカイン分泌の両方が含まれる。対照的に、コスティミュラトリーシグナルの不在下で抗原特異的シグナルがT細胞に送達されると非応答性の状態またはアネルギーがT細胞において誘導され、それによって抗原特異的な寛容がT細胞において誘導されると考えられている。

T細胞とB細胞との相互作用は免疫応答において中心的役割を果たしている。胸腺依存性抗原への体液性免疫の誘導にはThヘルパー (以下、Thという) 細胞によって提供される「ヘルプ」が必要である。Bリンパ球に提供されるある種のヘルプはTh細胞によって放出される可溶性分子 (たとえば、IL-4やIL-5などのリンホカイン) によって媒体されるが、B細胞の活性化にはまた接触依存性のB細胞とTh細胞との相互作用が必要である (ヒロハタ (Hirohata) ら、*J. Immunol.*、140: 3736~3744 (1988); バートレット

(Bartlett) ら、*J. Immunol.*、143: 1745~1754 (1989))

。このことは、B細胞の活性化にはB細胞およびTh細胞上の細胞表面分子間での必須の相互作用が関与していることを示している。それゆえ、Th細胞上の該分子はTh細胞の接触依存性のヘルパー効果機能を媒体している。B細胞およびTh細胞上の分子間の接触依存性の相互作用はさらに、活性化Th細胞から単離した原形質膜がB細胞の活性化に必要なヘルパー機能を提供しうるという観察によって支持されている。ブライアン (Brian) 、 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 564~568 (1988) ; ホジキン (Hodgkin) ら、 J. Immunol. 145 : 2025~2034 (1990) ; ノエル (Noelle) ら、 J. Immunol. 146 : 1118~1124 (1991)。

分子CD40は未成熟および成熟Bリンパ球の表面上で同定されており、抗体と架橋したときにB細胞の増殖を誘導する。バル (Valle) ら、 Eur. J. Immunol. 19 : 1463~1467 (1989) ; ゴードン (Gordon) ら、 J. Immunol. 140 : 1425~1430 (1988) ; グルーバー (Gruber) ら、 J. Immunol. 142 : 4144~4152 (1989)。CD40は分子レベルでクローニングされ、特徴付けられている。スタメンコビッチ (Stamenkovic) ら、 EMBO J. 8 : 1403~1410 (1989)。CD40のリガンドであるgp39 (CD40リガンドまたはCD40Lとも称する) もまた分子レベルでクローニングされ、特徴付けられている。アーミテージラ、 Nature 357 : 80~82 (1992) ; レーダーマン (Lederman) ら、 J. Exp. Med. 175 : 1091~1101 (1992) ; ホレンバウ (Hollenbaugh) ら、 EMBO J. 11 : 4313~4319 (1992)。gp39タンパク質は活性化されたCD4⁺Th細胞では発現されるが、休止のCD4⁺Th細胞では発現されない。スプリッグス (Spriggs) ら、 J. Exp. Med. 176 : 1543~1550 (1992) ; レーン (Lane) ら、 Eur. J. Immunol. 22 : 2573~2578 (1992) ; ロイ (Roy) ら、 J. Immunol. 151 : 1~14 (1993)。gp39遺伝子でトランスフェクトされ細胞表面上にgp39タンパク質を発現する細胞はB細胞の増殖を誘導することができ、他の刺激性シ

グナルとともに抗体の産生を誘導することができる。アーミテージら、Nature
、357：80～82（1992）；ホレンハウラ、EMBO J.、11：43
13～4319（1992）。

発明の要約

T細胞の接触依存性のヘルパー効果機能を媒体する細胞表面分子は、
T細胞ヘルプを必要とする免疫応答を誘導するのに重要である。たとえば、T細
胞上のgp39とB細胞上のCD40との相互作用は、抗原へのB細胞応答を活
活性化するうえで中心的な役割を果たしている。本発明は、少なくともその一部は
、接触依存性のヘルパー効果機能を媒体する細胞表面分子はまた抗原へ
のT細胞の応答において重要な役割を果たしているという見方に基づいている
。とりわけ、適切な条件下、T細胞上のgp39と該T細胞に抗原を呈示する細
胞上のリガンドとの間の相互作用を妨害することによって抗原特異的な寛容を誘
導できることがわかった。従って、該T細胞に抗原を呈示する細胞は、該T細胞
の活性化に必要なシグナルを提供しうるためには該細胞上のgp39リガンド（
たとえば、CD40）と該T細胞上のgp39との間の相互作用が必要である。
gp39とgp39リガンドとの間の相互作用を抑制するとT細胞活性化が妨害
され、抗原特異的なT細胞対応が誘導される。

本発明の方法は、抗原特異的なT細胞対応の誘導に関する。該方法には、T細
胞を、（1）該T細胞に抗原を呈示し、接触依存性のヘルパー効果機能
を媒体する該T細胞の表面上の受容体と相互作用するリガンドを表面に有する細
胞、および（2）接触依存性のヘルパー効果機能を媒体するT細胞の表
面上の該受容体のアンタゴニストと接触させることができが含まれる。該アンタゴニス
トは該受容体とそのリガンドとの相互作用を抑制する。T細胞を抗原を呈示する
細胞および該アンタゴニストとインピクトで接触させることができるし、または
該細胞と該アンタゴニストとを被験者に投与してT細胞対応をインピボで誘導す
ることもできる。

好ましい態様において、接触依存性のヘルパー効果機能を媒体するT
細胞の表面上の受容体はgp39である。この態様においては、アンタゴニスト

は g p 3 9 と該 T 細胞に抗原を呈示する細胞上のそのリガンドとの相互作用を抑制する分子である。特に好ましい g p 3 9 アンタゴニストは抗 g p 3 9 抗体である。別の態様として、g p 3 9 アンタゴニストは可溶性の形態の g p 3 9 リガンド、たとえば可溶性の CD 40 である。T 細胞に抗原を呈示する細胞は好ましくは B 細胞である。この B 細胞は小さな休止 B 細胞であってよい。可溶性抗原に対して T 細胞寛容を誘導するには、該 B 細胞を該 T 細胞に接触させる前に（たとえば、被験者に投与する前に）該抗原に接触させることができる。他の態様において、アロ抗原に対して T 細胞寛容を誘導する場合は、該 T 細胞に抗原を呈示するのに用いる細胞は同種細胞である。同種細胞は、たとえば、同種 B 細胞、同種骨髓、同種脾臓細胞または末梢血液中の同種細胞であってよい。

本発明の方法は、たとえば、可溶性抗原に対する T 細胞寛容を誘導するため、骨髄移植片または他の臓器移植に対する T 細胞寛容を誘導するため、または骨髄移植における対宿主移植片疾患を抑制するために用いることができる。骨髄移植の場合には、移植した骨髄細胞自身が本発明の方法において T 細胞に抗原を呈示する細胞として働く。従って、本発明の一つの態様において、同種骨髓を g p 3 9 アンタゴニスト（たとえば、抗 g p 3 9 抗体）とともに被験者に投与することによって骨髄の受け入れが促進される。

本発明はさらに、B 細胞増殖、B 細胞分化および T 細胞応答を抑制しうる抗ヒト g p 3 9 モノクローナル抗体、および該抗体を含む医薬組成物に関する。本発明の抗ヒト g p 3 9 モノクローナル抗体は一般に免疫応答を調節するため、および特に抗原特異的な T 細胞寛容を誘導するために使用するのが好ましい。好ましい抗体としては、実施例 6 に記載するモノクローナル抗体 3 E 4、2 H 5、2 H 8、4 D 9-8、4 D 9-9、2 4-3 1、2 4-4 3、8 9-7 6 および 8 9-7 9 が挙げられる。特に好ましい抗体はモノクローナル抗体 8 9-7 6 および 2 4-3 1 である。8 9-7 6 および 2 4-3 1 抗体をそれぞれ產生する 8 9-7 6 および 2 4-3 1 ハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に従ってアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、パークロンドライブ、ロックビル、メリーランドに 1994 年 9 月 2 日に寄託してある。8 9-7 6 ハイブリドーマ

はATCC受託番号_____を、24-31ハイブリドーマはATCC受託番号_____を付与された。24-31抗体および89-76抗体はIgG1イソタイプである。

従って、一つの態様において、本発明はIgG1イソタイプの抗ヒトgp39モノクローナル抗体(mAb)を提供する。本発明の抗ヒトgp39mAbは標準インビトロアッセイにおけるB細胞増殖、たとえばインターロイキン-4および可溶性gp39でB細胞を処理することにより誘導されるB細胞増殖を抑制することができる。抗ヒトgp39抗体によるB細胞増殖の抑制は、約0.01～5.0μg/ml、より好ましくは約0.1～2.5μg/ml、さらに一層好ましくは約0.1～1.25μg/mlのIC₅₀(すなわち、増殖を50%抑制するのに必要な濃度)で行うのが好ましい。本発明の抗ヒトgp39mAbはまた、標準インビトロアッセイにおけるB細胞によるIgG、IgMおよび/またはIgAの産生、たとえばB細胞を活性化T細胞(たとえば、抗CD3抗体で処理することによって活性化されたT細胞)とともに培養することによって誘導されるIgの産生を抑制することができる。IgG、IgMおよび/またはIgAのB細胞産生の抗gp39抗体による抑制は、約0.01～1.0μg/ml、または一層好ましくは約0.01～0.1μg/mlのIC50で行うのが好ましい。

好ましい態様において、本発明の抗ヒトgp39mAbは、3E4、2H5、2H8、4D9-8、4D9-9、24-31、24-43、89-76および89-79よりなる群から選ばれたモノクローナル抗体によって認識されるエプトープに結合する。さらに好ましくは、抗ヒトgp39mAbはモノクローナル抗体24-31またはモノクローナル抗体89-76によって認識されるエプトープに結合する。上記抗体のいずれかにより認識されるエプトープに結合するmAbの能力は、標準交差競合アッセイにより決定することができる。たとえば、mAb 24-31によって認識されるエプトープと同じエプトープに結合する抗体は標識24-31の活性化T細胞への結合に競合するであろうし、一方、mAb 24-31によって認識されるエプトープとは異なるエプトープに結合する抗体は標識24-31の活性化T細胞への結合に競合しないであろう。

本発明はまた、本発明の抗ヒト g p 3 9 抗体の医薬組成物をも提供する。これら組成物は一般に、抗ヒト g p 3 9 mA b (たとえば、好ましくは 2 4 - 3 1 または 8 9 - 7 6) および生物学的に許容しうる担体を含む。

本発明のさらに他の側面は、抗ヒト g p 3 9 mA b をコードする核酸 (たとえば、抗ヒト g p 3 9 mA b の免疫グロブリン H 鎮または L 鎮またはその一部をコードする DNA) に関する。かかる核酸は、抗ヒト g p 3 9 mA b を產生する細胞 (たとえば、ハイブリドーマ) から標準法により単離することができる。たとえば、2 4 - 3 1 または 8 9 - 7 6 mA b をコードする核酸は、それぞれ 2 4 - 3 1 または 8 9 - 7 6 ハイブリドーマから、c DNA ライブラリースクリーニング、PCR 増幅または他の標準法により単離することができる。抗ヒト g p 3 9 mA b 鎮をコードする核酸は、標準組換え DNA 法により操作して組換え抗ヒト g p 3 9 mA b 、たとえばキメラ化またはヒト化した抗ヒト g p 3 9 mA b を製造することができる。

さらに、抗ヒト g p 3 9 mA b をコードする核酸は、発現ベクター中に組み込み、宿主中に導入して組換え形態の抗ヒト g p 3 9 抗体の発現および產生を容易にすることができる。

図面の簡単な説明

図 1 は、インビポ抗 g p 3 9 抗体処理により誘導されたタンパク質抗原に対する T 細胞寛容を示すグラフである。T 細胞応答の測定は、抗 g p 3 9 抗体を用い、または用いることなく、すでにインビポで投与した抗原を抗原パルス標識した (antigen-pulsed) B 細胞に攻撃することによりインビトロで行った。

図 2 は、インビポ抗 g p 3 9 抗体処理により誘導された同種 B 細胞に対する T 細胞寛容を示すグラフである。T 細胞応答の測定は、抗 g p 3 9 抗体を用い、または用いることなく、すでにインビポで投与した同種 B 細胞で攻撃することによりインビトロで行った。

図 3 A は、受容動物を抗 g p 3 9 抗体で処理した場合の、同種 B 細胞によって誘導される一次同種 CTL 応答の抑制を示すグラフである。表示したグループは、未処理マウス (■) 、抗 g p 3 9 抗体処理マウス (△) および未感作 B a 1 b /

c マウスからの脾臓細胞（●；負の対照エフェクター細胞として使用）である。

図3Bおよび3Cは、受容動物を抗g p 3 9抗体で処理した場合の、LPS処理B幼若細胞によって誘導される一次同種CTL応答の抑制を示すグラフである。パネルBおよびCは2つの独立した実験を表す。表示したグループは、処理しない場合のインビボLPS幼若細胞（▲）、抗g p 3 9抗体処理したインビボLPS幼若細胞（●）、処理しない場合のインビボ休止B細胞（○）および抗g p 3 9抗体処理したインビボ休止B細胞（□）である。

図4Aは、受容動物を抗g p 3 9抗体で処理した場合の、同種B細胞によって誘導される二次同種CTL応答の抑制を示すグラフである。表示したエフェクターグループは、H Ig処理した受容者（■）、未感作（naive）B a 1 b / c（▲）および抗g p 3 9抗体処理した受容者（■）である。対応する同系応答（B a 1 b / c細胞で刺激したB a 1 b / c細胞）は白抜きの記号で示す。

図4Bは、抗g p 3 9抗体処理による同種CTL応答の抑制の特異性を示す。未感作B a 1 b / c細胞による（○）またはH-2^bハプロタイプB細胞および抗g p 3 9抗体を投与することによりH-2^bに対して寛容となった細胞による（■）H-2^k標的に対するCTL応答を示す。

図5は、抗g p 3 9抗体で処理した場合および処理しない場合の、骨髄移植を宿主に移植後の種々の時間における宿主の脾臓細胞の数を示す棒グラフである。

図6Aは、抗g p 3 9抗体でインビボ処理した場合および処理しない場合の、骨髄移植を受けたマウスから取り出した脾臓B細胞によりインピトロで產生されたIgAの濃度を示すグラフである。骨髄移植から7日後または14日後に脾臓B細胞を取り出し、抗体产生を測定した。

図6Bは、抗g p 3 9抗体でインビボ処理した場合および処理しない場合の、骨髄移植を受けたマウスから取り出した脾臓B細胞によりインピトロで產生されたIgG1の濃度を示すグラフである。骨髄移植から7日後または14日後に脾臓B細胞を取り出し、抗体产生を測定した。

図7Aは、抗g p 3 9抗体でインビボ処理した場合および処理しない場合の、骨髄移植を受けたマウスにおける骨髄移植後の種々の時間の血清IgE濃度を示す

すグラフである。

図7Bは、抗gp39抗体でインビオ処理した場合および処理しない場合の、骨髄移植を受けたマウスにおける骨髄移植後の種々の時間の血清抗DNA抗体濃度を示すグラフである。

図8Aおよび8Bは、抗gp39抗体でインビオ処理した場合および処理しない場合の、骨髄移植を受けたマウスからの細胞障害性T細胞のインビトロ細胞溶解活性を異なるエフェクター／標的細胞比（E:T比）で示すグラフである。パネルAおよびBは2つの独立した実験を示す。

図9A、9Bおよび9Cは、CD40 Ig（パネルA）、mAb4D9-8（パネルB）またはmAb4D9-9（パネルC）のいずれかによる6時間活性化ヒト末梢血リンパ球の染色を示すフローサイトメトリープロフィールである。

図10A、10Bおよび10Cは、mAb4D9-8（パネルA）、mAb4D9-9（パネルB）またはCD40 Ig（パネルC）のいずれかで染色し、シクロスボリンAの存在下で培養した6時間活性化ヒト末梢血リンパ球の染色を示すフローサイトメトリープロフィールである。

図11Aおよび11Bは、非標識mAb4D9-8（パネルA）または非標識mAb4D9-9（パネルB）の存在下、CD40 Igによる6時間活性化ヒト末梢血リンパ球の染色を示すフローサイトメトリープロフィールである。

図12は、細胞を抗ヒトgp39 mAb24D9-8、4D9-9、24-31、24-43、89-76または89-79の存在下で培養した場合の、可溶性gp39およびIL-4によって誘導されたヒトB細胞増殖の抑制を示すグラフである。

図13は、細胞を抗ヒトgp39 mAb24-31または89-79の存在下で培養した場合の、アロ特異的混合リンパ球応答の抑制を示すグラフである。

発明の詳細な記載

本発明は、抗原特異的なT細胞寛容の誘導方法に関する。本発明の方法には、T細胞を、（1）該T細胞に抗原を呈示し、接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する該T細胞の表面上の受容体と相互作用するリガントを表面に有す

る細胞、および(2)接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体するT細胞の表面上の該受容体のアンタゴニストと接触させることが含まれる。本明細書において接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する分子または受容体とは、Th細胞上で発現され、エフェクター細胞(たとえば、B細胞)上のリガンドと相互作用するものであって、該受容体とそのリガンドとの相互作用がエフェクター細胞の応答(たとえば、B細胞活性化)に必要であるものをいう。エフェクター細胞の応答に関与することに加えて、かかる分子はまた該T細胞の抗原への応答にも関与することが今やわかった。

接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体するT細胞上のおまじない分子はgp39である。従って、おまじない様において、本発明の方法にはT細胞を抗原を呈示する細胞およびgp39アンタゴニストと接触させることが含まれる。従って、抗原を呈示させるのに用いる細胞は、T細胞の表面上のgp39と相互作用して該T細胞を活性化させる(すなわち、該T細胞にT細胞活性化に必要なシグナルを送達する)ものである。たとえば、該細胞は、CD40を発現し、抗原をT細胞に呈示するB細胞であつてよい。抗原呈示細胞上のgp39リガンドと該T細胞上のgp39との相互作用を抑制することにより、該T細胞は呈示された該抗原によって活性化されず、該抗原に対して寛容となる。

本発明の方法は、インビロで抗原に対するT細胞寛容を誘導させるのに用いることができる。たとえば、T細胞に抗原を呈示する細胞を、接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体する該T細胞上に発現された受容体のアンタゴニスト(たとえば、gp39アンタゴニスト)とともに被験者に投与することができる。本発明の方法はさらに、T細胞を、接触依存性のヘルパーエフェクター機能を媒体するT細胞上に発現される受容体のアンタゴニスト(たとえば、gp39アンタゴニスト)とともに該T細胞に抗原を呈示する細胞とインビトロにて接触させることにより、抗原に対してT細胞をインビトロにて寛容にするのに用いることができる。ついで、インビトロで寛容にされたT細胞を被験者に投与することができる。本発明の方法は、特定の抗原に対して、または同種骨髄(たとえば、骨髄移植において)などの移植された細胞に対して被験者のT細胞を寛容にするの

に用いることができる。本発明の方法はまた、骨髄移植における対宿主移植片疾患を抑制するうえでも有用である。

本発明の種々の側面を以下の細項目においてさらに詳細に記載する。

I. gp 3 9アンタゴニスト：

本発明の方法によれば、gp 3 9アンタゴニストをT細胞と接触させて（たとえば被験者に投与して）、T細胞上のgp 3 9とB細胞などの抗原呈示細胞上のgp 3 9リガンドとの相互作用を妨害する。gp 3 9アンタゴニストとは、この相互作用を妨害する分子として定義される。gp 3 9アンタゴニストは、gp 3 9に対して向けられた抗体（たとえば、gp 3 9に対するモノクローナル抗体）やgp 3 9に対して向けられた抗体のフラグメントまたは誘導体（たとえば、FabまたはFab'）のフラグメント、キメラ抗体またはヒト化抗体）、可溶性形態のgp 3 9リガンド（たとえば、可溶性CD40）、可溶性形態のgp 3 9リガンドの融合タンパク質（たとえば、可溶性CD40Ig）、またはgp 3 9-CD40相互作用を破壊または妨害する薬剤であつてよい。

A. 抗体

哺乳動物（たとえば、マウス、ハムスター、またはウサギ）は、該哺乳動物において抗体応答を引き起こす免疫原の形態のgp 3 9タンパク質またはタンパク質断片（たとえば、ペプチド断片）で免疫することができる。その表面にgp 3 9を発現する細胞もまた免疫原として用いることができる。他の免疫原としては、精製したgp 3 9タンパク質またはタンパク質断片が挙げられる。gp 3 9の精製は、標準精製法によりgp 3 9発現細胞から行うことができる。gp 3 9cDNA（アーミテージら、Nature、357：80～82（1992）；レーダーマンら、J. Exp. Med.、175：1091～1101（1992）；ホレンバウラ、EMBO J.、11：4313～4319（1992））を宿主細胞、たとえば細菌または哺乳動物細胞株中で発現させ、細胞培養液から標準法に従ってgp 3 9タンパク質を精製することができる。gp 3 9ペプチドは、gp 3 9のアミノ酸配列（アーミテージら、Nature、357：80～82（1992）；レーダーマンら、J. Exp. Med.、175：1091～1101（1992）；

ホレンバウラ、EMBO J.、11：4313～4319（1992）に開示）に基づき、公知の方法（たとえば、F-mocまたはT-boc化学合成）により合成することができる。タンパク質に免疫原性を付与する技術としては、担体への結合、または当該技術分野でよく知られた他の方法が挙げられる。たとえば、タンパク質をアジュバントの存在下で投与することができる。免疫の進行は、血漿または血清中の抗体力値の検出によりモニターすることができる。抗体レベルを評価するため、抗原として免疫原を用いた標準ELISAまたは他のイムノアッセイを用いることができる。

免疫後、抗血清を得ることができ、所望ならポリクローナル抗体を該血清から単離することができる。モノクローナル抗体を产生するには、抗体産生細胞（リンパ球）を免疫動物から回収し、標準細胞融合法によりミエローマ細胞と融合させてこれら細胞を不死化し、ハイブリドーマ細胞を得る。かかる技術は当該技術分野においてよく知られている。たとえば、コーラーおよびミルシュteinにより最初に開発されたハイブリドーマ法（Nature（1975）256：495～497）、並びにヒトB細胞ハイブリドーマ法（コズバー（Kozbar）ら、Immunol. Today（1983）4：72）、ヒトモノクローナル抗体を产生するためのEBV-ハイブリドーマ法（コール（Cole）ら、Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy（1985）（アレン・アール・ブリス、77～96頁））、および結合（combinatorial）抗体ライブラリーのスクリーニング（ヒューズ（Huse）ら、Science（1989）246：1275）などの他の方法。該タンパク質またはペプチドに特異的に反応する抗体の產生についてハイブリドーマ細胞を免疫化学的にスクリーニングし、モノクローナル抗体を単離することができる。

本明細書において用いる抗体なる語は、gp39タンパク質またはそのペプチドまたはgp39融合タンパク質と特異的に反応するフラグメントをも包含する。抗体は常法によりフラグメントとすることができます、全抗体について記載したのと同様にしてフラグメントを有用性についてスクリーニングすることができる。たとえば、 $F(ab')_2$ フラグメントは抗体をペプシンで処理することにより生成さ

せることができる。得られた $F(a'b')_2$ フラグメントは、ジスルフィド架橋を還元すべく処理して $F(a'b')$ フラグメントとすることができます。本発明の抗体はさらに、抗 g p 3 9 部分を有する 2 特異的分子およびキメラ分子を包含する。

非ヒト被験者において產生された抗体をヒトの治療に用いる場合には、これら抗体は種々の程度で外来のものとして認識され、該患者において免疫応答が生じるかもしれない。この問題を最小限に抑えまたは排除する（一般的な免疫抑制に好ましい）一つの方法は、キメラ抗体誘導体、すなわち非ヒト動物の可変領域とヒトの定常領域とを組み合わせた抗体分子を作製することである。キメラ抗体分子としては、たとえば、マウス、ラットまたは他の種からの抗体の抗原結合ドメインをヒト定常領域と組み合わせたものが挙げられる。種々のキメラ抗体の作製法が記載されており、g p 3 9 を認識する免疫グロブリン可変領域を含むキメラ抗体を作製するのに用いることができる。たとえば、モリソン (Morrison) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 : 6851 (1985) ; タケダ (Takeda) ら、Nature 314 : 452 (1985) 、カビリー (Cabilly) ら、米国特許第4,816,567号；ボス (Boss) ら、米国特許第4,816,397号；タナグチ (Tanaguchi) ら、ヨーロッパ特許出願公開EP171496号；ヨーロッパ特許出願公開第0173494号、英国特許第GB2177096B号を参照。かかるキメラ抗体は、対応する非キメラ抗体に比べてヒト被験者における免疫原性が小さいことが期待される。

ヒトの治療目的に用いる場合、可変領域の一部、とりわけ抗原結合ドメインの保存されたフレームワーク領域をヒト由来のものとし、超可変領域のみを非ヒト由来のものとしたヒト可変領域キメラを作成することによって、g p 3 9 タンパク質またはペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはキメラ抗体をさらにヒト化することができる。かかる改変免疫グロブリン分子は当該技術分野で知られた幾つかの技術（たとえば、テング (Teng) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80 : 7308~7312 (1983) ; コズバーら、Immunology Today, 4 : 7279 (1983) ; オルソン (Olsson) ら、Meth. Enzymol., 92 : 3~16 (1982) ）のいずれによっても作製することができ、PCT

公開WO 92/06193号またはEP 0239400号の教示に従って作成するのが好ましい。ヒト化抗体は、たとえば、スコットジエン・リミテッド (Scotgen Limited)、グレートブリテン、ミドルセックス、トウイッケナム、ホリー・ロード2番によって商業的に製造することができる。

g p 3 9タンパク質またはペプチドに対して特異的に反応する特異的抗体、または抗体フラグメントの他の作製方法は、細菌中に発現された免疫グロブリン遺伝子またはその一部をコードする発現ライブラリーをg p 3 9タンパク質またはペプチドでスクリーニングすることである。たとえば、ファージ発現ライブラリーを用い、完全なF a b フラグメント、V H 領域およびF V 領域を細菌中で発現させることができる。たとえば、ウォード (Ward) ら、Nature、341: 544～546 (1989); ヒューズら、Science、246: 1275～1281 (1989); およびマッカファーティ (McCafferty) ら、Nature、348: 552～554 (1990) を参照。かかるライブラリーを、たとえばg p 3 9ペプチドを用いてスクリーニングすることにより、g p 3 9に反応性の免疫グロブリンフラグメントを同定することができる。別法として、S C I D-h uマウス (ジェンファーム (Genpharm) より入手可能) を用いて抗体またはそのフラグメントを作製することができる。

ヒトg p 3 9およびマウスg p 3 9を含むg p 3 9に対して向けられたモノクローナル抗体の作製方法および本発明の方法に使用するのに適したモノクローナル抗体については実施例6にさらに詳細に記載してある。本発明の特に好ましい抗ヒトg p 3 9抗体は、ハイブリドーマ24-31および89-76によってそれぞれ產生されたm A b 24-31および89-76である。89-76抗体および24-31抗体をそれぞれ產生する89-76ハイブリドーマおよび24-31ハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、パークロンドライブ、ロックビル、メリーランドに1994年9月2日に寄託してある。89-76ハイブリドーマはATCC受託番号_____を、24-31ハイブリドーマはATCC受託番号_____を付与された。

キメラ抗体やヒト化抗体などの組換え抗gp39抗体は、標準組換えDNA法に従い、抗gp39抗体をコードする核酸（たとえば、DNA）を操作することにより作製することができる。従って、本発明の他の側面は、gp39、とりわけヒトgp39に反応性の免疫グロブリンH鎖またはL鎖またはその一部をコードする単離核酸分子に関する。該免疫グロブリンをコードする核酸は、免疫グロブリンのL鎖またはH鎖可変領域をコードしていくよく、H鎖またはL鎖の定常領域（またはその一部）が結合していくても結合していくなくてもよい。かかる核酸は、抗ヒトgp39mAbを産生する細胞（たとえば、ハイブリドーマ）から標準法により単離することができる。たとえば、24-31または89-76mAbをコードする核酸は、それぞれ24-31ハイブリドーマまたは89-76ハイブリドーマからcDNAライブラリースクリーニング、PCR增幅その他の標準法により単離することができる。抗ヒトgp39mAbをコードする核酸を単離およびさらに操作した後、該核酸を発現ベクター中に組み込み、宿主細胞中に導入して組換え形態の抗ヒトgp39抗体の発現および産生を容易にすることができます。

B. gp39の可溶性リガンド

T細胞寛容を誘導するのに用いることのできる他のgp39アンタゴニストは、可溶性形態のgp39リガンドである。可溶性CD40などのgp39の1価可溶性リガンドはgp39に結合することができ、それによってgp39とB細胞上のCD40との相互作用を抑制する。「可溶性」なる語は、リガンドが細胞膜に永久的に結合していないことを示す。可溶性gp39リガンドは、化学合成によって、または好ましくは組換えDNA法によって、たとえば、該リガンドの細胞外ドメインのみ（絆膜ドメインおよび細胞質ドメインを欠く）を発現させることによって作製することができる。好ましい可溶性gp39リガンドは可溶性CD40である。別の態様として、可溶性gp39リガンドはまた融合タンパク質の形態であってもよい。かかる融合タンパク質は、第二の分子に結合した少なくとも一部のgp39リガンドを含む。たとえば、CD40は免疫グロブリンとの融合タンパク質（すなわち、CD40Ig融合タンパク質）として発現させること

ができる。一つの態様において、免疫グロブリンH鎖、たとえばC γ 1のヒンジ領域、CH2領域およびCH3領域に対応する配列のアミノ酸残基に結合したCD40分子の細胞外ドメイン部分のアミノ酸残基からなる融合タンパク質を作製してCD40Ig融合タンパク質を生成する（たとえば、リンスレイら（1991）J. Exp. Med. 1783: 721~730；カポン（Capon）ら（1989）Nature 337, 525~531；およびカポン米国特許第5,116,964号を参照）。融合タンパク質は、化学合成によって、または好ましくはCD40のcDNAに基づいて組換えDNA法によって作製することができる（スタメンコビッチら、EMBO J., 8: 1403~1410 (1989)）。

II. 抗原特異的な寛容を誘導する細胞：

本発明は、少なくとも一部、抗原を呈示しgp39と相互作用する細胞により該抗原がT細胞に呈示されると、該抗原の該T細胞への呈示がgp39アンタゴニストの存在下で行われた場合に抗原特異的なT細胞寛容が生じるという知見に基づいている。このメカニズムによるT細胞寛容を誘導しうる細胞としては、T細胞に抗原を呈示し、T細胞活性化に必要なシグナルを該T細胞に送達するためにその表面上のgp39リガンドと該T細胞上のgp39との相互作用を必要とする細胞が挙げられる。この相互作用を抑制することにより、呈示された抗原によるT細胞の活性化が妨害され、該T細胞において抗原特異的な寛容が誘導される。gp39を介したT細胞の活性化を妨害することにより、抗原呈示細胞上のコスティミュラトリーモル（たとえば、B細胞などの抗原呈示細胞上のB7ファミリー分子）の誘導が妨害され、該抗原呈示細胞はコスティミュラトリーシグナルの不在下で抗原性シグナルのみを送達しそれゆえ寛容が誘導される。

従って、本発明の方法において、抗原を呈示する細胞を受容者に投与する。「抗原を呈示する細胞」および「抗原呈示細胞」なる語は本明細書において同じ意味で用いられ、受容者のT細胞に抗原を呈示しうる細胞を包含し、Bリンパ球、「プロフェッショナル（professional）」抗原呈示細胞（たとえば、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞）および免疫細胞に抗原を呈示する他の細胞（たとえば、ケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、線維芽細胞、寡突起神経膠細胞）が含まれ

る。さらに、抗原呈示細胞は受容T細胞においてコスティミュラトリーシグナルを刺激する能力が減少しているのが好ましい。たとえば、抗原呈示細胞はB7ファミリーのタンパク質（たとえば、B7-1およびB7-2）などのコスティミュラトリーモルエット分子を発現しないかまたは低レベルしか発現しないでよい。本発明の方法において使用すべき可能な抗原呈示細胞上のコスティミュラトリーモルエット分子の発現は、標準法により、たとえば、コスティミュラトリーモルエット分子に対して向けられた抗体を用いたフローサイトメトリーにより評価することができる。

T細胞寛容を誘導するための好ましい抗原呈示細胞は、リンパ球細胞、たとえば末梢血リンパ球または脾臓細胞である。T細胞寛容を誘導するのに好ましいリンパ球細胞はB細胞である。B細胞は細胞の混合集団（たとえば、末梢血または脾臓中の他の細胞型）から標準細胞分離法により精製することができる。たとえば、接着細胞は、脾臓細胞をプラスチック皿上で培養し、ついで非接着細胞集団を回収することによって除去することができる。T細胞は、抗T細胞抗体（たとえば、抗Thy 1.1抗体および/または抗Thy 1.2抗体）および補体で処理することにより細胞の混合集団から取り出すことができる。一つの態様において、休止リンパ球細胞、好ましくは休止B細胞を抗原呈示細胞として用いる。休止B細胞などの休止リンパ球細胞の単離は、当該技術分野で知られた技術により、たとえばこれら細胞の小さなサイズおよび密度に基づいて行うことができる。休止リンパ球細胞の単離は、たとえば、トニー（Tony, H-P.）およびパーカー（Parker, D. C.）（1985）J. Exp. Med. 161: 223~241に記載された向流遠心エルトリエーション（counterflow centrifugal elutriation）により行うことができる。向流遠心エルトリエーションを用い、14~19ml/分、好ましくは19ml/分（3,200 rpm）にてフラクションを回収することにより、T細胞応答を活性化しうる細胞を含まない休止リンパ球細胞集団を得ることができる。別法として、たとえばフィコールまたはパーコール勾配を用いた不連続密度勾配遠心分離により小さな休止リンパ球（たとえば、B細胞）を単離することができ、遠心分離後に小さな休止リンパ球を含む層を得ることができる。小さな休止B細胞はまた、標準法（たとえば、蛍光抗体法）により、活性

B細胞などの抗原呈示細胞は、該T細胞に接触させる前に（たとえば、被験者に投与する前に）抗原（たとえば、可溶性タンパク質）と接触させることができ、該細胞を用いてg p 3 9アンタゴニストの存在下で該T細胞に該抗原を呈示させることにより該抗原に特異的なT細胞寛容を誘導させることができる（実施例1参照）。別法として、抗原呈示細胞として同種細胞を用いることにより、アロ抗原に対する寛容を誘導することができる（実施例2および3参照）。同種細胞はT細胞に同種タンパク質の抗原性断片を呈示する。一つの態様において、同種細胞は同種B細胞などの同種リンパ球細胞である。別法として、被験者はまた末梢血中の細胞（たとえば、末梢血リンパ球）、脾臓細胞または骨髄細胞で寛容にすることができる。骨髄移植の場合、ドナーの骨髄細胞自身がT細胞に接触する抗原呈示細胞として働く（たとえば、被験者に投与）。従って、同種骨髄をg p 3 9アンタゴニストとともに投与することにより、受容者において骨髄に対する寛容を誘導し、対宿主移植片疾患を防ぐことができる（実施例4および5参照）。

III. 細胞およびg p 3 9アンタゴニストの投与：

抗原特異的なT細胞寛容は、本発明に従い、T細胞に抗原を呈示し、該T細胞上のg p 3 9と相互作用するリガンドを発現する細胞とともにg p 3 9アンタゴニストを被験者に投与することによって誘導することができる。好ましい態様において、抗原呈示細胞およびg p 3 9アンタゴニストは同時に投与する。別法として、たとえばg p 3 9アンタゴニストが長い半減期を有する抗体である場合に、該細胞を投与する前に該アンタゴニストを投与することができる。投与しようとする細胞が骨髄細胞であり、対宿主移植片疾患の抑制が望まれる場合には、ドナー骨髄を受容者のB細胞およびg p 3 9アンタゴニストとともにインピトロでインキュベートすることにより、受容者宿主に移す前に該骨髄中のドナーT細胞を寛容にすることができる。g p 3 9処置は、必要なら骨髄を移す間または移した後にインピボで継続することができる。骨髄または他の臓器移植を受ける被験者において、該臓器または骨髄細胞を移す前に同種寛容を誘導させる治療計画で処置することにより、該被験者において該移植に対する同種寛容を誘導することができる。この前処置治療計画には、g p 3 9アンタゴニストとともにドナーの

細

胞を被験者に投与することが含まれる。ドナーの細胞としては、たとえば、B細胞、全末梢血またはそのフラクション（たとえば、末梢血リンパ球または小さな休止リンパ球またはB細胞）が挙げられる。

抗原呈示細胞の（アンタゴニストと組み合わせた）単回投与量の投与が、T細胞寛容を誘導するに充分であることがわかった（実施例参照）。投与する抗原呈示細胞の数は、使用した細胞のタイプ、組織または臓器移植のタイプ、受容者の体重、受容者の一般的な状態または当業者に知られた他の変数に依存して変わってよい。本発明の方法に使用する細胞の適切な数は、常法（たとえば、実施例に記載するアッセイを用いて）により当業者が決定することができる。細胞の投与は、受容者において寛容を誘導するのに適した形態および経路で行う。細胞の投与は、緩衝食塩水や同様のビヒクルなどの生理学的に許容しうる溶液中にて行うことができる。細胞は静脈内に投与するのが好ましい。

本発明のアンタゴニストは、T細胞寛容を誘導するため、インビボの医薬投与に適した生物学的に両立しうる形態にて被験者に投与する。「インビボの医薬投与に適した生物学的に両立しうる形態」とは、該タンパク質の治療効果が毒性作用より重視されるように投与されるアンタゴニストの形態をいう。被験者なる語は、免疫応答を引き起こしうる生物、たとえば哺乳動物を包含する。被験者の例としては、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびこれらのトランスジェニック種が挙げられる。g p 3 9アンタゴニストの投与は、任意に薬理学的に許容しうる担体中にて医薬形態で行うことができる。治療学的に活性な量のアンタゴニストの投与とは、所望の結果を達成するのに必要な投与量および時間にて有効な量と定義される。たとえば、g p 3 9のアンタゴニストの治療学的に活性な量は、個体の疾患状態、年齢、性および体重、および該アンタゴニストが該個体において所望の応答を引き起こす能力に従って変わってよい。投与計画は最適の治療応答をもたらすように調節する。たとえば、幾つかの分割投与量を毎日投与することができるし、または治療状況の緊急性によって示されるように比例して投与量を減らしていくこともできる。

活性化合物（たとえば、アンタゴニスト）の投与は、注射（皮下、静脈内など）

、経口投与、吸入、経皮投与、または直腸投与などの常法により行うことができる。投与経路に応じて、活性化合物を不活化する酵素、酸または他の天然の条件から該化合物を保護するために該化合物を物質中にコーティングすることができる。好ましい投与経路は静注である。

非経口以外の投与により g p 3.9 のアンタゴニストを投与するには、不活化を防ぐ物質で該アンタゴニストをコーティングするかまたは該物質と該アンタゴニストとを同時に投与する必要がある。たとえば、アンタゴニストは、適当な担体または希釈剤中にて、または酵素阻害剤とともにまたはリポソームなどの適当な担体中にて一緒に投与することができる。薬理学的に許容しうる希釈剤としては、食塩および水性緩衝液が挙げられる。酵素阻害剤としては、脾臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロホスフェート (D E P) およびトランシロール (trasylol) が挙げられる。リポソームとしては、水中油中水懸濁液並びに通常のリポソーム (ストレジャン (Strejan) ら (1984) J. Neuroimmunol 7 : 27) が挙げられる。

活性化合物はまた、非経口または腹腔内投与することもできる。グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれら混合物中、および油中で分散液を調製することもできる。通常の貯蔵および使用条件では、これら調製物には微生物の増殖を防ぐための保存剤が含まれる。

注射用途に適した医薬組成物としては、滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散液および滅菌注射用溶液または分散液を即座に調製するための滅菌粉末が挙げられる。いずれの場合においても組成物は滅菌されていなければならず、容易な注射器操作が可能な程度に流体でなければならない。該組成物は製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌や真菌などの混入微生物の作用から保護されていなければならない。担体は、たとえば、水、エタノール、ポリオール（たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適当な混合物を含む溶媒であるかまたは分散媒体で

あってよい。適当な流動性は、たとえば、レシチンなどのコーティングを使用することによって、分散液の場合は必要な粒径を維持することによって、および界

面活性剤を使用することによって維持することができる。微生物の作用からの保護は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、たとえばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサールなどにより行うことができる。多くの場合、等張剤、たとえば糖、ポリアルコール、たとえばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどが組成物中に含まれているのが好ましいであろう。注射用組成物の持続吸収は、吸収を遅らせる薬剤、たとえばモノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどを組成物中に配合することにより行うことができる。

滅菌注射用溶液の調製は、必要なら上記成分の1またはその組み合わせとともに所要量の活性化合物（たとえば、g p 3.9のアンタゴニスト）を適当な溶媒中に配合し、ついで滅菌濾過することにより行うことができる。一般に分散液の調製は、基本的な分散媒体と上記から選ばれた必要な他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化合物を配合することにより行う。滅菌注射溶液の調製のための滅菌粉末の場合は、好ましい調製法は真空乾燥および凍結乾燥であり、これにより活性成分（たとえば、アンタゴニスト）と前以て滅菌濾過した溶液からの所望の追加成分との粉末が得られる。

上記のように活性化合物を適切に保護してある場合は、該タンパク質は、たとえば不活性な希釈剤または同化しうる食用担体とともに経口投与することができる。本明細書において「薬理学的に許容しうる担体」とは、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などのすべてを包含する。薬理学的に活性な物質のためのかかる媒体および剤の使用は、当該技術分野でよく知られている。通常の媒体または剤が活性化合物と両立しない場合以外は、治療学的組成物中に使用することができる。補助的な活性化合物を該組成物中に配合することもできる。

投与の容易および投与量の均一さのため、単位投与剤型で非経口組成物に調合するのが特に有利である。本明細書において単位投与剤型とは、治療すべき哺乳動物被験者に対する単位投与量として適した物理的に区別される単位をいう。各

単位には、所要の薬理学的担体と組み合わせて所望の治療効果を奏するように計算された前以て決定された量の活性化合物が含まれる。本発明の単位投与剤型は

(a) 活性化合物の独特の特性および達成しようとする特定の治療効果、および
(b) 個体における治療感受性 (treatment of sensitivity) のためにかかる活性化合物を調合する際の内在する技術的制約に直接依存して個々に特定される。

インビボでのT細胞の寛容に加え、本発明はまた、たとえばg p 3 9アンタゴニストの存在下で抗原呈示細胞と接触させることによる、インビトロでのT細胞の寛容をも包含する。たとえば、T細胞を被験者から採取し、抗原呈示細胞およびアンタゴニストとともに培養することによってインビトロで寛容にし、ついで該T細胞を被験者に再投与することができる。

IV. 本発明の方法の用途：

本発明の方法は、種々の抗原に対してT細胞寛容を誘導するために応用することができる。たとえば、実施例1に記載するように、可溶性抗原（たとえば、可溶性タンパク質）に対してT細胞寛容を誘導することができる。T細胞の寛容はまた、自己免疫疾患または異常な免疫応答を伴う疾患に関与する抗原に対して行うことができる。たとえば、一つの態様において、抗原は自己抗原である。他の態様において、抗原はアレルゲンである。別の態様において、T細胞の寛容はまた外来細胞上に発現される抗原に対して行うことができる（実施例2～5に記載する）。従って、さらに他の態様において、抗原はアロ抗原または異種抗原である。アロ抗原および異種抗原に対するT細胞寛容の誘導は、ドナーの移植片、たとえば組織または臓器移植片または骨髄移植の移植受容者による拒絶を抑制するために移植において特別の用途を有する。加えて、骨髄移植中のドナーT細胞の寛容は、対宿主移植片疾患を抑制するのに有用である（実施例5参照）。

本発明を下記実施例によりさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。本明細書中に引用した全ての参考文献、特許および公開された特許出願の内容は参照のため本明細書中に引用される。

実施例1：抗原特異的な寛容の誘導

方法

マウスをK L H-パルス標識した脾臓Bリンパ球で5日間免疫した。一次免疫の間、動物を抗g p 3 9抗体M R Iで処理するかまたは処理しなかった。最初の

免疫から5日後、マウスをフロイントの完全アジュバント（C F A）中のK L Hで局所（食趾（food pad））攻撃した。マウスを5日後に屠殺し、取り出したリンパ節の水を切り、その後、K L Hに対するT細胞増幅応答をインビトロでアッセイした。

結果

抗原でパルス標識した活性化Bリンパ球で免疫し、その後、同抗原で攻撃した動物は、免疫を行った該抗原に対して有意の免疫応答を生じる。抗原特異的Tリンパ球の増殖により測定した応答を図1に示す。一次免疫の間に抗g p 3 9抗体で動物を処理すると、インビトロで抗原攻撃したときに抗原特異的なTリンパ球の非応答性という結果となった。抗g p 3 9抗体で処理した動物のリンパ節から得られたTリンパ球は、未処理の動物のリンパ節から得られたTリンパ球に比べて低下した増殖能を示す。

実施例2：同種細胞に対するT細胞寛容の誘導

方法

B a l b / c (H-2^d) マウスをD B A / 2 (H-2^b) マウスからの同種脾臓B細胞で免疫した。免疫後の5日間、動物を抗g p 3 9抗体、M R Iで処理するかまたは処理しなかった。第6日目に動物を屠殺し、脾臓を取り出した。その後、抗g p 3 9抗体で処理した動物または未処理動物からの脾臓を刺激なしでまたは照射D B A / 2 脾臓細胞とともにインビトロで培養した。この二次同種刺激に対する増殖応答を培養の開始後3日目に測定した。

結果

同種脾臓B細胞で免疫した動物からのTリンパ球は、同細胞でインビトロにて5日後に攻撃したときに強い増殖応答を生じる（図2）。しかしながら、同種B細胞で免疫し抗g p 3 9抗体で処理したマウスからのTリンパ球は、その後インビトロで攻撃したときに低下した増殖能を有する。抗g p 3 9抗体処理したマウ

スは、対照の未処理動物に比べて攻撃に対する応答性において約50%の低下を示す。

実施例3：抗g p 3 9抗体処理は同種B細胞に対するCTL応答の生成を妨害する

る

本実施例においては、細胞障害性T細胞（CTL）の生成におけるg p 3 9の役割を調べた。CTLの発生におけるg p 3 9のインビボ機能を評価するため、同種B細胞で免疫することによるアロ特異的なCTLの生成に対する抗g p 3 9抗体処理の効果を調べた。一次CTL応答および二次CTL応答の両方に対する抗g p 3 9抗体処理の効果を決定した。

一次CTL応答

同種B細胞がインビボでアロ特異的なCTL応答を引き起こすのを抗g p 3 9抗体が妨害しうるか否かを試験するため、同種B細胞（T細胞を欠く脾臓細胞）を抗g p 3 9抗体とともに、または抗g p 3 9抗体なしで受容者のマウスに投与した。Balb/cマウス（雌、6～8週齢、ジャクソン・ラボラトリーズ（Jackson Laboratories）、バーーハーバー、メイン州）を、抗Thy 1.2抗体（ATCCクローンHO 13.4から調製した腹水）およびウサギ補体処理によりT細胞を欠くC57BL/6（雌、6～8週齢、ジャクソン・ラボラトリーズ、バーーハーバー、メイン州）脾臓細胞（30～50×10⁶）で免疫した。ついで、これら受容者のマウスを抗g p 3 9抗体で5日間処理するか（第0日目、第2日目および第4日目に250mg/受容者）または処理しなかった。第5日目に脾臓を取り出し、4時間クロム放出アッセイを用いてCTL応答を測定した。未感作Balb/cマウスからの脾臓細胞を負の対照エフェクター細胞として用いた。使用した標的細胞は、E雄K1（H-2^b、C57BL/6株由来のT細胞リンパ腫）およびP815（H-2^d、肥満細胞腫、DBA/2J株由来）であった。⁵¹Cr-標識した標的細胞を洗浄し、エフェクター細胞とともにエフェクター：標的（E:T）比が100:1、20:1および4:1で96ウエルプレート中にウエル当たり1×10⁴細胞にてブレーティングした。プレートを簡単に遠心分離にかけ、ついで5%CO₂中、37℃にて4時間インキュベートした

。プレートをもう一度遠心分離にかけ、各ウエルから 100 ml の細胞不含上澄み液を回収し、ガンマカウンティングにかけた (LKB クリニガンマ (LKB C linigamma) 、ウォレス (Wallace Inc.) 、ゲイザーズバーグ、メリーランド州)。

ト州)。特異的溶解%を $(a - b) / c$ と定義する (式中、 a = エフェクター細胞とともにインキュベートした標的細胞により放出される cpm、 b = 培地のみでインキュベートした標的細胞により放出される (自然放出) cpm、および c = 標的細胞から凍結-解糖により放出可能な cpm (導入された全 cpm の約 80%))。P815 標的是、試験した細胞試料のいずれによっても溶解しなかった。E 雌 K1 標的の結果を図 3A に示す。図 3Aにおいて、図示したグループは、未処理マウス (■)、抗 gp39 抗体処理マウス (Δ) および未感作 Ba1b/c マウスからの脾臓細胞 (●; 負の対照エフェクター細胞として使用) である。これら結果は、抗 gp39 抗体および同種細胞を与えられたマウスは同種 B 細胞に応答してインビボで一次 CTL 応答を生成しないことを示す。対照的に、抗 gp39 抗体が存在しないと、同種 B 細胞はアロ抗原に対して受容者を感作し、実質的な CTL 応答を誘導する。

抗 gp39 抗体が活性化されていない脾臓 B 細胞の対応原作用のみを増幅するか否かを決定するため、LPS-活性化 B 細胞を用いて抗 gp39 抗体の存在下または不在下で CTL を感作させた。C57BL/6 マウスからの B 細胞を上記と同様にして調製し、リボ多糖 (LPS; 50 mg/ml; シグマ・ダイアグノスティックス (Sigma Diagnostics) 、セントルイス、ミズーリ州) の存在下または不在下で 2 日間培養した。ついで、細胞を回収し、充分に洗浄し、Ba1b/c 受容マウスに腹腔内注射した ($30 \sim 50 \times 10^6$)。受容マウスを上記のように第 0 日目、第 2 日目および第 4 日目に抗 gp39 抗体で処理するかまたは処理しなかった。第 5 日目に脾臓細胞を取り出し、CTL 応答を上記と同様にして決定した。2 つの独立した実験の結果を図 3B に示す (上段および下段のパネル)。図示したグループは、処理なしのインビボ LPS 幼若細胞 (blasts) (>)、抗 gp39 抗体処理したインビボ LPS 幼若細胞 (●)、処理なしのインビボ 休止 B 細胞 (○)、および抗 gp39 抗体処理したインビボ 休止 B 細胞 (○)

□)である。これら結果は、完全ではないが、抗g p 3 9抗体はまた同種LPS幼若細胞に対する一次CTL応答をも減少させることを示している。

二次CTL応答

CTL生成に対する抗g p 3 9抗体および同種B細胞の投与の影響を調べるために、処理および未処理マウスからの脾臓細胞をインビトロで刺激し、CTL応答の範囲を調べた。Balb/cマウスを上記と同様にしてC57BL/6由来のB細胞でインビボにて感作させた。抗g p 3 9抗体および対照のハムスターIg(H Ig)処理した動物から脾臓細胞を取り出し、種々のマイトマイシンC処理した(37°Cにて2.5mg/ml、シグマ・ダイアグノスティックス、セントルイス、ミズーリ州)脾臓B細胞の株(抗T hy 1.2抗体+補体処理により調製)とともに 5×10^6 スティミュレーター/mlにて5日間培養した(「レスポンダー(responders)」)。スティミュレーターグループはC57BL/6(H-2^b)およびBalb/c(H-2^d)であり、それぞれ二次同種応答および一次同系応答を示す。スティミュレーター細胞およびレスポンダー細胞を、新たに調製した感作RPMI-1640培地(バイオ・ホワイテーカー(Bio Whitaker)、ウォーカースビル、メリーランド州)、 1×10^5 M 2-メルカプトエタノール(バイオーラド・ラボラトリーズ(Bio-Rad Laboratories)、ハイキュールズ、カリフォルニア州)、2mM L-グルタミン(シグマ・ダイアグノスティックス、セントルイス、ミズーリ州)、500U/mlベニシリンおよび5000U/mlストレプトマイシン(シグマ・ダイアグノスティックス、セントルイス、ミズーリ州)中で培養した。5日後、レスポンダー細胞を回収し、死細胞を密度勾配遠心分離により除去した。得られた生細胞を上記CTLアッセイにおいてエフェクターとして用いた。標的にはE雄K1(H-2^b, C57BL/6株由来のT細胞リンパ腫)およびP815(H-2^d, 肥満細胞腫、DBA/2J株由来)が含まれていた。その結果を図4Aに示す。図示した同種刺激エフェクターグループは、H Ig処理受容者(●)、未感作Balb/c(>)および抗g p 3 9抗体処理した受容者(■)である。対応する同系応答(Balb/c細胞で刺激したBalb/c細胞)は白抜きの記号で示す。予想された

ように、抗 g p 3 9 抗体の不在下で同種 T 欠損脾臓細胞 (H-2^b) でマウスをインピボ免疫すると、インピトロで強い二次 CTL 応答となった。マウスに抗 g p 3 9 抗体を与えた場合には、強められた二次抗 H-2^b CTL 応答は観察されなかつ

た。

抗 g p 3 9 抗体による CTL 応答の抑制の特異性を決定するため、上記脾臓細胞培養を、CTL アッセイにおいてステミュレーターとして B 1 0 B R (H-2^k) 脾臓 B 細胞を、標的として S L 8 (H-2^k、AKR 株由来の特発性 T 細胞リンパ腫) を用いて抗 H-2^k 同種応答 (第三者同種応答) について分析した。その結果を図 4 B に示す。図示したグループは、未感作 B a l b / c (○) よりび抗 g p 3 9 抗体処理した受容者 (■) である。これら結果は、抗 g p 3 9 抗体処理による抗 H-2^b 特異的 CTL 応答の抑制がアロ特異的であることを示している。なぜなら、H-2^b 脾臓細胞および抗 g p 3 9 抗体の投与が傍観者であるアロ抗原 (H-2^k) に対するインピトロ CTL 応答に変化をもたらさなかったからである。

以上を総合すると、これらデータは、抗 g p 3 9 抗体がアロ特異的な CTL 応答 (一次および二次の両者) の生成を妨害することを示している。抗 g p 3 9 抗体の存在下では、関連するアロ抗原に特異的な CTL 前駆体はなお存在している。なぜなら、インピトロの二次培養において若干の抗 H-2^b CTL 活性を示すことができるからである。抗 g p 3 9 抗体処理は、CTL 感作 (priming) を阻止することにより、または感作アロ特異的 CTL の頻度を減少させることにより、二次インピトロ応答を減少させたと結論することができる。休止 B 細胞の使用は、この非応答性を示すために強制的なものではない。なぜなら、L P S 幼若細胞によって誘導された同種 CTL 応答もまた抗 g p 3 9 抗体によって損なわれたからである。

実施例 4 : 同種マウス骨髄の移植は、受容者を g p 3 9 に対する抗体で処理した場合には安定なキメラを誘導する

従来の化学療法では治癒され得なかった多くの血液疾患の治療には、同種骨髄

の移植が含まれる。この攻撃的な療法には、クロノジェニックな (clonogenic) 腫瘍細胞を撲滅させるべく、同種骨髓の灌流と組み合わせた骨髓腫を撲滅しうる (myeloablative) 高投与量の化学療法剤の投与が含まれる。

胸腺を照射して胸腺T細胞を欠失させると、抗CD4モノクローナル抗体

(mAb) を含むT細胞に対するmAbを使用した場合に安定なキメラの頻度が増大することがすでに示されている。この抗体療法により、T細胞消失、それゆえドナー特異的な寛容が得られ、このことはドナー皮膚移植に対する寛容によって示される。300ラドのWB I、インビポ抗T細胞mAb処理、および同種骨髓の投与後に永久的な同種移植を達成できないのは、胸腺内の影響を受けないT細胞によるものである。抗CD4mAbおよび抗CD8mAbの使用により末梢血および脾臓のT細胞の有効な消失をもたらし得るが、胸腺のT細胞はmAbでコーティングされるのみで消失されるわけではない。それゆえ、胸腺照射をマウスに行う。

方法

対宿主移植片疾患が誘導されるのを回避するため、親へのF1の同種骨髓移植(BMT)のマウスモデルを用いた。本発明者らは、(C57BL/6×Balb/c) F1であるF1株CB6を用い、その結果、H-2^{d/b}の全MHCハプロタイプとなった。骨髓を取り出し、抗gp39抗体MR1とともに、または抗gp39抗体なしで、照射したBALB/c親に静脈内注射した。キメラ化(chimerism)の最良のレベルを決定するため、および各照射レベルで抗gp39抗体処理した動物と処理しない動物とを比較するため、全身照射(whole body irradiation)(WB I) レベルを変化させた。キメラ化の決定は、H-2^d(BALB/c) マウス内に存在するH-2^bMHCハプロタイプの末梢血リンパ球のフローサイトメトリーにより行った。このマウスの組み合わせが適しており、500および600ラドWB Iのレベルでキメラ現象が得られることが以前に示されている。

結果

フローサイトメトリーによりC57BL/6由来細胞(H-2^b)の同定を行

うことによってキメラ化を検出した。この研究の開始のときから抗gp39抗体で処理した場合にのみ、400、500および600全身照射にて照射したマウスにおいて14日以内にキメラ化が出現することがわかった。600全身照射を受けた場合に400ラドの抗体処理群と同じ程度に骨髄を受け入れたのを例外として、抗体処理を受けなかったマウスはすべての照射レベルにおいて細胞を拒絶

した（表1）。抗gp39抗体療法とともに400、500および600ラドで治療後6週間のキメラ化のレベルは、それぞれ70.7+5.74、94.1および84.4+8.56であったのに対し、抗体処理なしでの600ラドでは85.7+5.9キメラであることがわかった（表2）。この時点では細胞を表現型で分類すると、T細胞、B細胞およびマクロファージはすべてキメラ化され、処理した場合の400ラドでの程度は未処理群の600ラドでの程度と同じであった（表2）。また、抗gp39抗体処理は、末梢内でのリンパ球細胞のいずれの全百分率集団をも有意に変化させないとと思われた。抗gp39抗体により動物の処理が終了したとき、これら動物は移植後8週間まで安定にキメラ化されることがわかった。

表1

全身照射レベル (ラド)	抗gp39抗体で処理した キメラ動物の数	抗gp39抗体で処理しない キメラ動物の数
0	0 (5)	0 (5)
200	0 (5)	0 (5)
400	9 (9)	0 (9)
450	3 (5)	0 (5)
500	4 (5)	2 (5)
600	7 (9)	7 (9)

キメラ化を生じる全身照射のレベル。括弧内の数字は各レベルでの被験動物の総数を示す。

表2

<u>ラド</u>	<u>処理</u>	<u>IL-2K^{b±}</u>	<u>B細胞 IL-2K^{b±}</u>	<u>T細胞 IL-2K^{b±}</u>	<u>Mac. IL-2K^{b±}</u>
400	+	70.7 ± 5.74	89 ± 2.6	45.9 ± 13.3	82.3 ± 3.3
500	+	94.1	100	89	100
600	+	84.4 ± 8.56	99.3 ± 0.94	72.3 ± 15.9	91.1 ± 8.3
600	-	85.7 ± 5.9	97.3 ± 1.77	67.1 ± 10.3	91 ± 9

H-2 k b ± 標準誤差について陽性のB細胞、T細胞およびマクロファージ(Mac) のパーセント

実施例5：抗g p 3 9抗体による受容者の処理と組み合わせた同種骨髄移植は急性および慢性の対宿主移植片疾患を抑制する

本実施例においては以下の方法を用いた。

マウス：DBA/2 (H-2^d)、C57BL/6 (H-2^b) およびB6D2F₁ ((C57BL/6 (H-2^d) × DBA/2) F₁ハイブリッド) マウスをNCIラボラトリーズ(ペセスダ、メリーランド州)から入手し、ダートマス・メディカル・スクールの動物施設中のウイルス不含環境中で維持した。この研究に使用したマウスはすべて雌であり、6～8週齢であった。

慢性GVHDの誘導：慢性GVHDの誘導を、親(DBA/2)の脾臓細胞を非照射(C57BL/6 × DBA/2) F₁ハイブリッド受容者に静脈内注射することにより行った(Fast, L. D.) (1990)、J. Immunol. 144: 4177)。脾臓を取り出すため、親マウスを麻酔し、頸部脱臼により屠殺した。分離した脾臓細胞を洗浄し、F₁受容者に静脈内注射するため RPMI 1640培地中に再懸濁した(ホワイテーカー、ウォルダースビル、メリーランド州)。

急性GVHDの誘導：急性GVHDの誘導は、親C57BL/6脾臓細胞を非照射(C57BL/6×DBA/2)F₁ハイブリッド受容者に静脈内注射することにより行った。慢性GVHDの誘導の場合と同様にして、移植のための細胞を調製した。

抗体：抗gp39抗体：以前に記載されているようにして（フォイラ（1993）J. Exp. Med. 178: 1567~1575；ノエル（Noelle, R. J.）ら（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 6550）、MR1を腹水中に産生させ、イオン交換HPLCにより精製した。ポリクローナル抗イソタイプ抗体：抗IgG1抗体および抗IgA抗体および標準対照はすべてザーン・バイオテクノロジー・アソシエーツ（Southern Biotechnology Associates, Inc.）（バーミンガム、アラバマ州）から入手した。抗IgE抗体：IgE特異的ELIZA用いる抗IgE抗体（BIE3およびビオチンAM95）および標準（A3B1）はすべて、ワルドシュミット（T. Waldschmidt）博士（アイオワ州）から親切に贈呈されたものであった。抗MHCハプロタイプ抗体：H-2K^bFITC結合抗体およびH-2D^dビオチン結合抗体をファーミンジエン（PharMingen）（サンジエゴ、カリフォルニア州）から入手した。

細胞株：使用した細胞株にはP815（H-2^d）およびLB27.4（H-2^{bxd}）が含まれ、これらはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手した。細胞株c1.18.5（H-2b）はウイリアム・アール・グリーン（William R. Green）博士から親切に贈呈されたものであった。

インビトロでのポリクローナルIg産生：対照およびcGVHDマウスから脾臓を取り出し、単一細胞懸濁液を調製した。細胞をトリス緩衝塩化アンモニウムで処理して赤血球を除去し、血球計で目視でカウントすることにより全白血球数を決定した。細胞（5×10⁶）を1mlの完全(c) RPMI-1640培地（10%ウシ胎仔血清（ハイクローン（Hyclone）、ローガン（Logan）、ユタ州）、25mM HEPES、2mM-L-グルタミン、5000U/mlペニシリンおよび5000mg/mlストレプトマイシンを添加）中、37°C、5%CO₂にて3日間インキュベートした。細胞をペレット化することにより培養上澄み液を

回収し、イソタイプ特異的ELISAアッセイにより Ig を定量した。

イソタイプ特異的および抗原特異的ELISA : IgG₁およびIgAの検出のためのELISA : PBS中のヤギ抗マウスIgG₁およびIgA(10μg/ml; サザーン・バイオテクノロジー・アソシエーツ、バーミンガム、アラバマ州)を96-wellポリビニルマイクロタイタープレートのウェル上に、37℃にて1時間、ついで4℃にて一夜吸着させた。プレートを洗浄し、1%FCSを含有するPBSで37℃にて1時間ブロックした。プレートを再び洗浄し、上澄み液の適当な希釈液および標準対照(IgG₁およびIgA、サザーン・バイオテクノロジー・アソシエーツ、バーミンガム、アラバマ州)を37℃にて2時間かけて加えた。この時間後、プレートを3回洗浄し、アルカリホスファーゼを結合したヤギ抗マウスIgG₁またはIgA(1/500希釈)(サザーン・バイオテクノロジー・アソシエーツ、バーミンガム、アラバマ州)を37℃にて2時間かけて加えた。プレートを充分に洗浄し、ホスファーゼ基質(1mg/ml; シグマ・ダイアグノスティックス(Sigma Diagnostics)、セントルイス、ミズーリ州)を加え、適当な発色変化を起こさせた。410nmの吸光度をELISAリーダー(ダイナティック・ラボラトリーズ(Dynatech Laboratories, Inc.))で読み取ることにより読み取りを行った。適当なイソタイプ標準曲線と比較することによってIgの濃度を決定し、平均+標準誤差(n=3)として表した。

IgEの検出のためのELISA : 96-wellポリビニルマイクロタイタープレートのウェルを抗マウスIgE捕捉抗体(B1E3(2mg/ml))で4℃にて一夜コーティングし、ついで1%FCSを含有するPBSで37℃にて1時間ブロックした。プレートを再び洗浄し、上澄み液の適当な希釈液および標準対照(A3B1(IgE))を37℃にて2時間かけて加えた。プレートを充分に洗浄し、各ウェルにEM95-ビオチン(5mg/ml)を加え、37℃にて2時間インキュベートした。この時間の後、ストレプトアビジンに結合したアルカリホスファーゼをさらに2時間かけて加え(1/500希釈)、ついでホスファーゼ基質(1mg/ml; シグマ・ダイアグノスティックス、セントル

イス、ミズーリ州) を加える前に充分に洗浄し、適当な発色変化を起こさせた。410 nm の吸光度を ELISA リーダー (ダイナテック・ラボラトリーズ) で読み取ることにより読み取りを行った。標準曲線と比較することによって Ig の濃度を決定し、平均±標準誤差 (n=3) として表した。

抗 DNA 抗体の検出のための ELISA : 0.1M 炭酸ナトリウム / 重炭酸ナトリウムを含有するカップリング緩衝液 (pH 9.8) 中でウシ胸腺 DNA (シグマ、セントルイス、ミズーリ州) を溶解した。これを 10 分間沸騰させ、ついで氷上で 3 分間インキュベートした。ついで、この DNA の OD 260 を決定し、所望の 5 μg/ml の DNA が得られるよう濃度を調節した。ついで、100 μl を 96 ウエルポリビニルマイクロタイヤープレートのウエルに加え、4°C にて一夜インキュベートした。ついで、プレートを 3 回洗浄し、1% C F C S および 0.02% アジ化ナトリウムを含む PBS で 37°C にて 1 時間ブロックした。プレートを再び洗浄し、ついで系列希釈の血清試料を加え (100 ml) 、37°C にて 2 時間インキュベートした。ついで、検出抗体、ヤギ抗マウス IgG₁ アルカリホスファターゼを各ウエルに加え、37°C にて再び 2 時間インキュベートした。プレートを充分に洗浄し、ホスファターゼ基質 (1 mg/ml; シグマ・ダイアグノスティックス、セントルイス、ミズーリ州) を加え、適当な発色変化を起こさせた。410 nm の吸光度を ELISA リーダー (ダイナテック・ラボラトリーズ) で読み取ることにより読み取りを行った。抗体力値を陽性血清試料と比較し、結果を任意の単位で表した。

ドナー由来の細胞の検出のためのフローサイトメトリー分析：正常 BDF₁、抗 g p 3.9 抗体で処理した cGVHD マウスおよび処理していない cGVHD マウスから脾臓細胞を取り出し、単一細胞懸濁液を調製した。細胞をフィコールハイパック (4:1) 上に重層し、ついで室温で 2000 rpm にて 20 分間遠心分離にかけた。得られたリンパ球層を取り、5% FCS を含有する BSS で 1 回洗浄した。チューブ当たり 1×10^6 細胞を 50 μl の最終容量中で染色のため用いた。各チューブに 50 μl のラット血清を加えて抗体の非特異的結合を防いだ。細胞を (a) 対照抗体：ラット Ig FITC (1:100 最終希釈) お

およびPE-ストレプトアビシン（1：500最終希釈）および（b）FITC-H-2K^bおよびビオチンH-2D^d（ともに1：100最終希釈）で染色した。細胞を氷上で20分間インキュベートし、ついで2回洗浄して未結合抗体を除去した。最後にPE-ストレプトアビシン（1：500最終希釈）を適当なチューブに加えてビオチン結合抗体を氷上でさらに20分間検出した。細胞をさらに2回洗浄してベクトンディッキンソンFACスキャン（FACScan）上で分析するための準備をした。前および側部スキャッターによる陽性ゲーティングの後、関連するMHCハプロタイプについて陽性の細胞のパーセントを決定するために試料当たり10,000の事象を集めた。

CTLアッセイの評価のためのクロム放出アッセイ：⁵¹Cr-標識標的細胞を洗浄し、エフェクター細胞とともにE:T比100:1、20:1および4:1にて96ウエルプレート中にウエル当たり 1×10^4 でブレーティングした。使用した標的細胞には、P815 (H-2^d)、LB27.4 (H-2^{bxd}) および c118.5 (H-2^b) が含まれていた。プレートを簡単に遠心分離にかけ、ついで5%CO₂中、37°Cにて4時間インキュベートした。プレートをもう一度遠心分離にかけ、細胞不含上澄み液のアリコートを各ウエルから回収してガンマカウンターでカウントした。特異的溶解パーセントは、(a-b)/c (式中、a=エフェクター細胞とともにインキュベートした標的細胞から放出されるcpm、b=培地とのみインキュベートした標的細胞から放出される（自然放出）cpm、およびc=標的細胞について凍結-融解放出可能なcpm（導入した全cpmの約80%）)として定義される。

急性GVHD脾臓細胞のインビトロでの二次刺激：急性GVHD脾臓を、抗gp39抗体処理した動物、H Ig処理した動物、または未処理動物から取り出した。脾臓の赤血球を欠失させ、ついで細胞ウエル当たり 1×10^4 のアリコートとした。照射したスティミュレーター細胞（P815）を上記のように適当な標的細胞に加えた。

化B細胞の表面上のB7-1および/またはB7-2などのコスティミュラトリーワン子の発現をアッセイすることにより活性化B細胞から区別することができる。

結果

マウスにおけるGVHDは脾腫となる

マウスにおいてcGVHDの結果の一つは脾臓の肥大である。これはドナー細胞の存在に応答して生じるものであるが、脾臓中に浸潤し肥大させるのは主として宿主自身の細胞である（ロリンク（Rolink, A. G.）ら（1983）J. Exp. Med. 158: 546）。図5は、cGVHDの開始から7～14日後には、脾臓がcGVHDのないマウスに比べてほとんど2倍の数の白血球を含むことを示している。cGVHDの開始のときにマウスを抗gp39抗体で処理すると（250μg/マウス、第0日目、2日目、4日目、および6日目）、cGVHDマウス中の白血球/脾臓の数が疾患のないマウスと同等の値まで減少する。

GVHDによって誘導されたポリクローナル免疫グロブリンの過剰産生

cGVHDを有するマウスではドナーT細胞とB細胞との間の同族相互作用のためにIgの過剰産生が起こることが報告されている（モリス（Morris, S. E.）ら（1990）J. Exp. Med. 171: 503）。抗gp39抗体がIgの過剰産生を抑制するかどうかを決定するため、cGVHDを有するマウスに抗gp39抗体を投与した。第7日目または14日目に対照およびcGVHDマウスから脾臓を取り出し、インビトロでのIgG₁およびIgAの自然産生についてB細胞をアッセイした。cGVHDを有するマウスの脾臓細胞はインビトロで高レベルのIgAおよびIgG₁を産生した（図6Aおよび6B）。しかしながら、cGVHDを有し抗gp39抗体で処理した（第0日目、2日目、4日目および6日目）マウスでは、疾患を有しないマウスと同等のレベルでIgG₁およびIgAを産生した。cGVHDを有するマウスの脾臓細胞の培養液に抗gp39抗体を加えてもインビトロでのIg産生レベルは減少せず、抗gp39抗体がインビオでその作用を発揮することが示唆された。

これら実験においてハムスターIg（HIg）を対照として用いると、GVHDの誘導において何ら抑制的役割を示さず、実際にはポリクローナルIgの産生のみならず結果としての脾腫においても該疾患が強調されることがわかった。未処理の1週間GVHD誘導マウスに比べ、1週間HIg処理したGVHD誘導マウ

スにより產生されるIgのレベルは8倍増加することが検出された。H Igはそれ自体免疫原であることは明白であった。従って、未処理のF₁受容マウスを関連対照群と表示することに決定した。

G VHDにより誘導された血清の過剰なIgEおよび抗DNA自己抗体に対する抗gp39抗体の作用

cGVHDの経過は、血清IgEおよび二本鎖DNAに対する抗体の上昇によりモニターできる（モリスら（1990）J. Exp. Med. 171: 503）。血清IgEレベルはIgE特異的なELISAを用いて測定した。慢性GVHDが誘導されたマウスを抗gp39抗体で第0日目、2日目、4日目および6日目に処理し、その後、何ら抗体を投与しなかった。マウスを1週間毎に採血し、血清IgEレベルを確かめた（図7A）。cGVHDは血清IgEレベルを10～15倍増加させる。抗gp39抗体の投与は、cGVHDによって誘導された血清IgEの増加を疾患の開始から8週間後まで抑制した。上昇血清IgEの抑制に加え、抗gp39抗体の投与はまた血清の抗DNA自己抗体の生成を阻止した。慢性GVHDは抗DNA抗体のレベルを5～10倍上昇させるが、これが抗gp39抗体処理によって減少した（図7B）。

以前の研究によると抗gp39抗体（MR1クローン）の半減期は12日である（フォイら（1993）J. Exp. Med. 178: 1567～1575）。抗gp39抗体の検出に特異的なELISAアッセイは、治療後8週間の処理マウスの血清で抗gp39抗体が検出されないことを示している。それゆえ、持続する抗gp39抗体ではcGVHDの長引いた抑制を説明できない。cGVHDを有するマウスおよび抗gp39抗体を投与したマウスからの脾臓細胞がcGVHDを転移しうるか否かを調べるために、転移研究を行った。cGVHDおよび抗gp39抗体を受けた脾臓細胞は養子転移（adoptive transfer）によりIgEおよび抗DNA自己抗体の上昇血清レベルを誘導できなかったが、一方、cGVHDを有するマウスの脾臓細胞は高められたsIgEおよび抗DNA抗体を誘導した。これらデータは、アロ反応性のT細胞が誘導されて抗gp39抗体処理の結果、非応答性になったことを示唆している。

アロ反応性のドナー細胞の検出

ドナー由来の細胞の脾臓内での存在について c GVHD 誘導したマウスを分析したところ、H-2K^bおよびH-2D^dに対して二重に陽性に染色される正常な BDF₁と比べ、c GVHD は約 5~7% のドナー細胞を有していた。これら細胞は DBA/2 由来であり、それゆえ H-2D^dに対してのみ陽性に染色される。これら細胞は抗 g p 3 9 抗体処理とは無関係に検出された。このことは、未処理の c GVHD 群においてポリクローナル 1 g の產生をもたらす受容 B 細胞に対するヘルパー機能を生じさせることなく抗 g p 3 9 抗体処理がドナー細胞の移植を可能とする時点を示している。

急性GVHDの誘導に対する抗 g p 3 9 抗体処理の効果

急性GVHD は、増大した抗同種 CTL 応答の誘導を伴う。g p 3 9 - CD 40 相互作用が T_h-B 細胞相互作用に重要であることは明らかであるが、他の免疫エフェクター機構の誘導もまた抗 g p 3 9 抗体療法によって変化を受けるのかどうかについては明らかではない。AGVHD を F₁ 受容者に C57BL/6 脾臓を投与することにより誘導した。図 8 に示すように、同種細胞の移植から 12 日後に強い H-2^b 抗 H-2^d CTL 応答が測定される。マウスを HIg ではなく抗 g p 3 9 抗体で処理すると、H-2^b 抗 H-2^d CTL の生成が妨害された（図 8）。2つの実験のうち一つにおいて、抗 g p 3 9 抗体で処理すると CTL 応答が未感作脾臓細胞で観察されるものよりも低い程度まで減少した。このことは、攻撃したときに GVHD マウスからの脾臓細胞を示唆した。ついで、これら脾臓細胞を照射 P 815 細胞の存在下で 7 日間培養し、ついで CTL アッセイを行うと、これら細胞は該 P 815 細胞に対して二次刺激を起こさなかったが、正常な BDF₁ 脾臓は一次応答を起こした。未処理の a GVHD 誘導マウスは、予想通り二次免疫応答を起こした。これら結果は、急性GVHD マウスを抗 g p 3 9 抗体で処理すると CD8+ 集団が二次攻撃に対して非応答性になることを示している。

考察

抗 g p 3 9 抗体投与による GVH 誘導マウスにおける脾腫の逆転（図 5）、過

刺Ig産生の抑制（図6Aおよび6B）、IgEおよび抗DNA自己抗体産生の血清レベルの抑制（図7Aおよび7B）は、抗gp39抗体が移植したT細胞が宿主B細胞活性化を誘導する能力を阻止することを示唆している。この腫瘍およびポリクローナルIgG₁およびIgA産生の抑制は抗体投与終了の7日後に低いままである。IgEおよび抗DNA抗体の減少は、該処理の終了後8週間持続する。これら結果は、反応性T細胞のクローン性消失かまたはT細胞アネルギーが起こったかのいずれかによりT細胞機能が影響を受けたことを示している。サイトカイン産生細胞レベルは抗体処理マウスにおいて正常のままであることが免疫マウスのインシトゥ研究において以前に示されている（ファン・デン・アートウェ（Van den Eertwegh）ら（1993）J. Exp. Med. 178: 1555～1565）。このことは該処理の結果としてT細胞が消失しないことを示している。cGVHDマウスをドナー由来細胞の存在について分析すると、未処理であるか抗gp39抗体で処理したかに関係なく存在することがわかった。それゆえ、抗gp39抗体は、これらドナーティー細胞に非応答性の状態を誘導する能力を有し、抗体応答の抑制を引き起す。実際、これら動物の脾臓を未感作の受容者に移植すると、ドナーの脾臓が未処理のcGVHDである場合に抗体レベルが上昇するが、抗gp39抗体処理したcGVHDマウスは移植後に二次cGVHD状態を生じさせることができない。このデータは、抗gp39抗体がT細胞が強いGVHD臨床免疫病理学および腫瘍を引き起す能力を妨害すること、抗体投与がCD4⁺サブ集団に非応答性を引き起すことを示唆している。

フリンド（Friend）マウス白血病ウイルス誘発白血病に対する防御T細胞免疫を誘導させるためのB細胞欠失マウスの研究によって認められるように、CTLの誘導のためにヘルプを提供するにはB細胞が必要である（シュルツ（Schultz, K. R.）ら（1990）Science 249）。それゆえ、aGVHD誘導マウスにおいて抗gp39抗体はB細胞の活性化を抑制し、それゆえ抗原の呈示を妨害し、かくしてCD8⁺T細胞を感作するものと思われる。CD8⁺CTLの生成にはクラスII制限（class II-restricted）Th細胞が必要であること（ジョン・ベーマー（von Boehmer, H.）ら（1979）J. Exp. Med. 150: 1

134; キーン (Keene, J.) ら (1982) *J. Exp. Med.* 155: 768) および TCR 親和性が低い場合には CD4+ 媒体 T 細胞ヘルプがインビボで必要であることもまた示唆されている (ガオ (Gao, X.) ら (1991) *J. Immunol.* 147: 3268)。

CD8+ CTL 応答の誘導における CD28-B7/B21 相互作用の役割を考察する研究が行われている。CD28-B7/B21 相互作用はクラス I MH C 特異的 CTL の生成に必要であり充分であることがわかった (ハーディング (Harding, F. A.) およびアリソン (Allison, J. P.) (1993) *J. Exp. Med.* 177: 1791)。CD40に対する抗体による正常および白血病 B 細胞での B7 発現の抑制を含む研究によって示されるように、CD40 のリガンドが B7 の重要なインデューサーであるかもしれないことが示唆されている (ランハイム (Ranheim, E. A.) およびキップス (Kipps, T. J.) (1993) *J. Exp. Med.* 177: 925)。以上を総合すると、これら研究は、抗 gp39 抗体は、CD4+ T 細胞と B 細胞との相互作用を阻止することによって、増殖およびサイトカインの産生を可能とするほど充分に B 細胞が T 細胞を活性化させるようになる B7 の発現を誘導できないようにすることを示している。以上を要するに、このデータは、まず gp39 とそのリガンド CD40 との間の T-B 細胞同族相互作用による CTL 生成の誘導に CD4+ T 細胞が必要であることを示唆している。ついで、B 細胞上の CD40 のシグナル生成 (signaling) は B7/B21 を上方制御 (upregulation) する。ついで、B7/B21 と T 細胞上のリガンド CD28 との相互作用が T 細胞増殖およびサイトカイン産生を促進させる。しかしながら、T 細胞に一つのシグナルのみが提供される、すなわち gp39 と CD40 との相互作用のみの場合には、第二のシグナルは得られない。ついで、T 細胞において非応答性が誘導され、寛容となり、またはアネルギーとなる。

これら研究は、aGVHD がマウスに誘導される場合には抗 H-2^d 応答が得られることを示している。しかしながら、動物を抗 gp39 抗体で処理すると CTL 応答は得られない。抗 gp39 抗体は、以前に記載された方法によって (シユルツラ (1990) *Science* 249) CTL 生成を抑制することが明らかであ

る。B細胞はCD40結合によって活性化されず、それゆえCTLの誘導を促進することができない。さらに、本発明者らの研究は、脾臓細胞をインビトロでP815細胞で攻撃した場合に、抗gp39抗体にインビボで暴露された細胞は二次抗H-2^dCTLを起こさせることができないことを示している。それゆえ、このことは、抗gp39抗体がT細胞区画に寛容の状態を誘導したことを見ている。なぜなら、gp39はCD40に結合することができないからであり、かくしてB7/B21上方制御は存在せず、それゆえT細胞はさらに活性化されることなく非応答性のままである。また、休止B細胞は、抗IgM抗体、PMAまたはLPSで前以て活性化されない限り、混合リンパ球反応において同種T細胞の効果のないステイミュレーターであることも知られている（イナバ（Inaba, K.）およびステインマン（Steinman, R. M.）（1989）J. Exp. Med. 160: 1717；メットレイ（Metley, J. P.）ら（1989）J. Exp. Med. 169: 239；フローマン（Frohman, M.）およびカウイング（Cowing, C.）（1985）J. Immunol. 134: 2269）。加えて、インビボでの呈示のためのB細胞に向けられた可溶性のモノマーアン原は特異的T細胞アネルギーとなる（エイノン（Eynon, E. E.）およびパーカー（Parker, D.）（1992）J. Exp. Med. 175: 131）。それゆえ、関与する抗原およびAPCの投与法に依存してアネルギーまたは寛容が誘導されることが明らかであると思われる。脾臓のCD8+T細胞区画にP815細胞を攻撃させると、抗原呈示のためにB細胞は必要ではなく、かくしてアロ抗原を直接呈示することができ、CTLを誘導することができる。該脾臓の二次刺激への非応答性は、この系においてアロ特異的な寛容が誘導されたことを示している。

このことは、抗原特異的な系において抗体によって寛容が誘導されないことを示す以前の研究（フォイラ（1993）J. Exp. Med. 178: 1567~1575）と反対である。これら2つの系は異なる。というのは、aGVHDモデルは抗原呈示細胞にすでに結合したアロ抗原を呈示するのに対して、抗原特異的な系では抗原を投与し、インビボで取り込み、プロセスを受け、プロフェッショナルAPCによって呈示されるからである。それゆえ、抗gp39抗体は使用した

抗原および呈示方法に依存して異なる効果を有する。

抗 g p 3 9 抗体は免疫系の CD 4 + および CD 8 + 区画の両方においてアロ特異的な寛容を誘導すること、およびこのことは移植免疫学および免疫療法を考慮する場合に明らかに有利な治療的介入であることが結論付けられる。骨髄移植を受けている患者の治療において、抗 g p 3 9 抗体療法は該移植に対する寛容を誘導するに充分であり、GVHDなどのような移植処置による結果の誘導を防ぐであろうことが考えられる。

実施例 6 : 抗 g p 3 9 抗体の產生および特徴付け

実験 1 - ヒト g p 3 9 に対する抗体

ヒト被験者において抗原特異的な T 細胞寛容を誘導するには、ヒト g p 3 9 に対する抗体を投与するのが好ましい。マウス抗ヒト g p 3 9 モノクローナル抗体を作製するため、以下の方法を用いた。Balb/c マウスを完全フロイントアジュvant (CFA) 中の可溶性 g p 3 9 融合タンパク質、g p 3 9 - CD 8 で免疫した。引き続き、マウスを不完全フロイントアジュvant (IFA) 中の可溶性 g p 3 9 - CD 8 で 6 週間後に攻撃した。二次免疫の 4 週間後に可溶性 g p 3 9 - CD 8 を可溶性の形態で与えた。ついで、2 週間後にマウスを活性化ヒト末梢血リンパ球でブースター処理し、ついでさらに 2 週間後に活性化 g p 3 9 - CD 8 で最後のブースター処理を行った。最後の免疫から 4 日目に標準プロトコールに従って脾臓細胞を NS - 1 融合相手と融合させた。

抗 g p 3 9 抗体を產生する細胞を、複数スクリーニング法に基づいて選択した。クローンをまず、g p 3 9 - CD 8 を用いたプレート結合アッセイによりスクリーニングした。ついで、陽性のクローンを対照の CD 8 融合タンパク質である CD 72 - CD 8 に対してスクリーニングした。CD 8 - CD 72 プレート結合アッセイで陽性とされたクローンを排除した。残ったクローンを、引き続き休止および 6 時間活性化ヒト末梢血リンパ球 (PBL) 上でスクリーニングし、ついでフローサイトメトリー分析を行った。活性化された PBL は染色するが休止 PBL は染色しないハイブリドーマを陽性とした。最後に、残りのクローンを g p 3 9 の結合したプレートへの CD 40 Ig の結合を阻止する能力について試験した。

プレート結合アッセイにおいて、約300クローンがg p 39-CD8およびCD72-CD8に対して最初にスクリーニングされた。これらクローンのうち、30のクローンはプレートに結合したg p 39を検出するがCD8は検出しないことがわかった。引き続き、これらクローンを活性化ヒトPBL上のg p 39の検出についてスクリーニングした。約15のクローンが活性化PBL上の分子を検出したが、休止細胞上の分子は検出しなかった。これらクローンがプレートに結合したg p 39のCD40 Ig検出を阻止する能力を決定することにより特異性をさらに確認した。10のクローンのうち3つのクローンが、このアッセイにおいてCD40 Ig結合を阻止することが試験された。これらクローンは、3E4、2H5および2H8であった。かかるクローンは本発明の方法に使用するのに好ましい。活性化PBLでは陽性だが休止PBLでは陽性ではないと試験されたクローンを、活性化されたラットT細胞クローンであるPOMC8との反応性についてもスクリーニングした。クローン2H8はこのラットT細胞株との交差反応性を示した。

実験2-ヒトg p 39に対する抗体

実験1と同様の免疫手順を用い、ヒトg p 39に対する別の抗体を産生させた。1匹のBalb/cマウスをCFA中の可溶性g p 39-CD8で免疫し、ついで4週間後に6時間活性化ヒト末梢血リンパ球で攻撃した。脾臓細胞をNS-1融合相手と標準プロトコールに従って融合させる4日前に、マウスを可溶性g p 39-CD8でブースター処理した。ハイブリドーマクローンのスクリーニングを6時間活性化ヒトPBLのフローサイトメトリー染色により行った。活性化ヒトPBLは染色するが休止ヒトPBLは染色しないクローンを選択した。6つのクローン、4D9-8、4D9-9、24-31、24-43、89-76および89-79を選択し、さらに分析した。

これら選択した抗体の特異性を幾つかのアッセイにより確認した。まず、フローサイトメトリー分析は、6つのすべてのmAbが活性化末梢血T細胞を染色するが休止末梢血T細胞は染色しないことを示した（代表的な例について図9Bおよび9Cを参照、それぞれ、活性化T細胞の4D9-8および4D9-9による

染色を示す）。これら6つの抗体のそれぞれによって認識される分子の発現は、活性化の4時間以内には検出可能であり、活性化の6～8時間で最大であり、活性化の24時間後には検出できない。6つのすべてのmAbは活性化CD3⁺PBL上に発現される分子（主としてCD4+表現型の）を認識するが、CD8⁺T細胞の一部もまた該分子を発現する。これら6つのmAbによって認識される分子の発現は、gp39の発現と同様に培地中のシクロスボリンAの存在によって抑制される（代表的な例について図10Aおよび10Bを参照、それぞれ、シクロスボリン処理T細胞の4D9-8および4D9-9による染色を示す）。これら6つのmAbによって認識される分子の発現の動力学および分布は、ヒトCD40Igの融合タンパク質によって検出されるようにgp39のものと同一である。加えて、これら6つのすべてのmAbはCD40Igによるgp39の染色を阻止する（代表的な例について図11Aおよび11Bを参照、それぞれ、4D9-8および4D9-9の存在下でのCD40Igによるgp39染色の抑制を示す）。ELISAアッセイにおいて、これら6つのすべてのmAbは可溶性融合形態のgp39分子であるgp39-CD8を認識する。さらに、これら6つのすべてのmAbは、³⁵S-メチオニン標識した活性化ヒトPBLから約36kDaの分子を免疫沈降させる。この免疫沈降した分子は、ヒトCD40Ig融合タンパク質によって沈降したものと同一である。

上記6つの選択したmAb（4D9-8、4D9-9、24-31、24-43、89-76および89-79）の機能的活性を以下のようにしてアッセイした。まず、IL-4および可溶性gp39とともに培養した精製ヒトB細胞の増殖をmAbが抑制する能力を測定した。精製ヒトB細胞を、精製モノクローナル抗体またはCD40Ig（0～12.5μg/mlの範囲の投与量）の存在下または不在下でgp39およびIL-4とともに培養した。培養3日後にチミジン導入によりB細胞増殖を決定した。得られた結果（図12に示す）は、6つのすべてのmAbがgp39およびIL-4によって誘導されるB細胞増殖を抑制しうることを示している。mAb 89-76および24-31は誘導B細胞増殖の抑制において最も効果的であった。IC₅₀（B細胞増殖を50%抑制するのに

必要な抗体の濃度)は、89-76については約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、24-31については約 $1.25\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

つぎに、抗CD3抗体活性化T細胞およびIL-2によって誘導されるIg産生により測定されるように、B細胞分化をmA_bが抑制する能力を調べた。精製IgD⁺ヒトB細胞をFACSによる陽性選択により調製し、ついで精製抗gp39モノクローナル抗体(0~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲の投与量)の存在下または不在下、抗CD3抗体活性化ヒトT細胞(マイトイシンC処理)およびIL-2とともに6日間培養した。IgM、IgGおよびIgA産生を第6日目にELISAにより評価した。得られた結果(下記表3に示す)は、IgM、IgGおよびIgA産生によって測定されるように、これら6つのすべての抗体はT細胞依存性B細胞分化を抑制していることを示している。IC₅₀(Ig産生を50%抑制するのに必要な抗体の濃度)は、24-31抗体および89-76抗体を含む上記6つのmA_bについて $1.0\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ から $0.1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 未満の範囲であった。

表3

mAb なし	$\mu\text{g/ml}$	免疫グロブリンの產生		
		IgM	IgG	IgA
4D9-8	-	17,500	6710	4471
	0.1	4813	2130	2819
	1.0	4394	2558	1519
4D9-9	10.0	1081	389	396
	0.1	3594	919	1731
	1.0	2659	1233	1606
24-31	10.0	374	448	266
	0.1	3863	981	344
	1.0	1287	314	165
24-43	10.0	1120	596	23
	0.1	6227	4132	432
	1.0	3193	2130	192
89-76	10.0	7021	1232	1081
	0.1	3783	1069	344
	1.0	2180	352	171
89-79	10.0	818	551	19
	0.1	9763	1924	3021
	1.0	2314	460	156
	10.0	183	135	434

T細胞応答に対する抗gp39mAbの作用を調べるため、これらmAbを標準混合リンパ球反応（MLR）中に含めた。300,000個のヒト末梢血リンパ球（レスポンダー=R）を抗gp39mAb（10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の存在下または不在下、100,000個の照射同種末梢血リンパ球（スティミュレーター=S）とともに培養した。培養液を第4日目、5日目または6日目に³H-チミジンでパルス標識し、18時間後に回収した。6つのすべての抗ヒトgp39mAbは、MLRによって測定されるようにアロ特異的応答を抑制した（代表的な例について図13を参照、RおよびSを24-31および89-76の存在下でインキュベートした場合のアロ特異的応答の抑制を示す； CTLA4-免疫グロブリン融合タンパク質および抗CD28mAbを正の対照として用いた）。

上記6つのmAbがヒトgp39分子上の異なるエピトープを認識するのかどう

うかを決定するため、交差実験を行った。まず、活性化ヒトPBLを上記6つのmAbのそれぞれで阻止した(25 μg/mlの未結合抗体)。細胞を洗浄し、ついで10 μg/mlのビオチン結合抗体で染色し、ついでフィトエリトリン(phytoerythrin)結合アビシン(PE-Av)と反応させた。PE-Avでの細胞の染色をFACSにより分析した。その結果を下記表4に示す。

表4

ブロッキング		染色抗体				
Ab	4D9-8	4D9-9	24-31	24-43	89-76	89-79
なし	+++	+++	++++	++++	++++	++++
4D9-8	ND	-	+++	+++	++	++
4D9-9	+++	ND	++	+++	++	++
24-31	+	+	ND	++	++	++
24-43	+	+	++	ND	++	+
89-76	+	+	++	++	ND	++
89-79	+	++	++	++	++	ND

染色の強度および陽性細胞のパーセントを+の記号で示す(++++=MI > 200; +++=MI > 125; ++=MI > 50; + = MI > 25; - = バックグラウンドを越える染色なし)。ND=決定せず。

すべての抗体が活性化ヒトPBLへのCD40 Igの結合を阻止した。しかしながら、表4に示すデータは、幾つかの抗体は他の抗体が活性化ヒトPBLに結合するのを阻止できないことを明らかに示しており、これらがヒトgp39分子上の異なるエピトープを認識することを示唆している。

89-76抗体および24-31抗体をそれぞれ産生する89-76および24-31ハイブリドーマは、ブダペスト条約の規定に従い、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション、パークローンドライブ、ロックビル、メリーランド州に1994年9月2日に寄託してある。89-76ハイブリドーマはATCC受託番号_____、24-31ハイブリドーマはATCC受託番号_____を与えられた。24-31抗体および89-76抗体はIgG1イソタイプである。

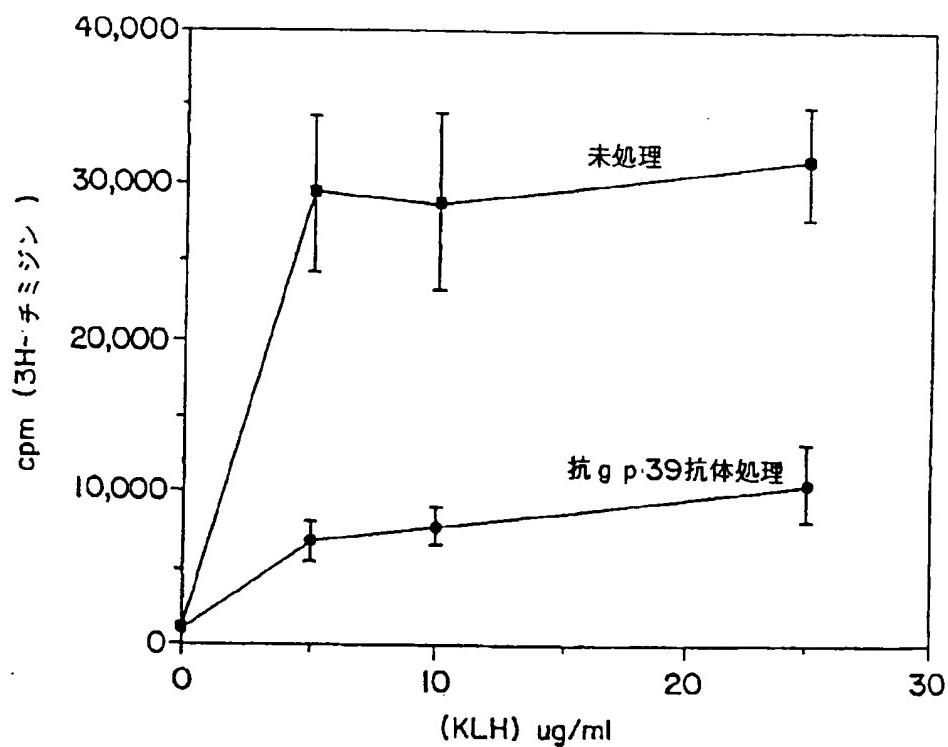
実験3—マウスgp39に対する抗体

本発明の一つの態様において、g p 3 9アンタゴニストは抗マウス g p 3 9モノクローナル抗体、MR 1である。以下の方法を用いてMR 1モノクローナル抗体を作製し、g p 3 9に対する他の抗体を作製するのにも用いることができる。

ハムスターを5～10⁶個の活性化T_h1細胞(d 1.6)で1週間間隔で6週間腹腔内免疫した。マウスT_h1に対する血清力価が約1：10,000よりも大きいときに、免疫ハムスターの脾臓細胞およびNS-1を用いてポリエチレンリコールで細胞融合を行った。増殖するハイブリドーマを含むウエルからの上澄み液を休止T_h1および活性化T_h1に対するフローサイトメトリーによりスクリーニングした。活性化T_h1を選択的に認識するMa bを產生した一つの特定のハイブリドーマをさらに試験し、サブクローニングしてMR 1を得た。MR 1は腹水中で產生され、イオン交換HPLCにより精製した。ハイブリドーマMR 1はアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに寄託しており、受託番号HB 11048を与えられた。

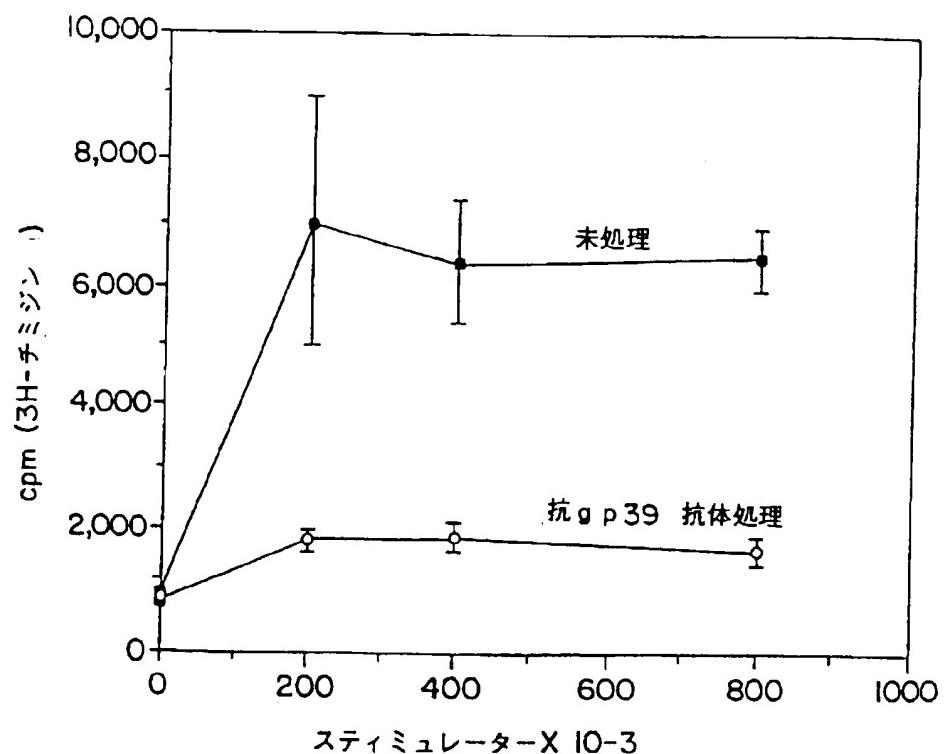
【図1】

FIG. 1



【図2】

FIG. 2



【図3】

FIG. 3A

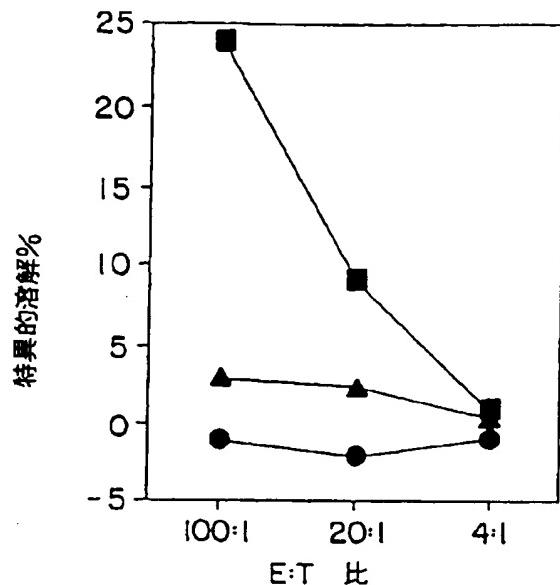


FIG. 3B

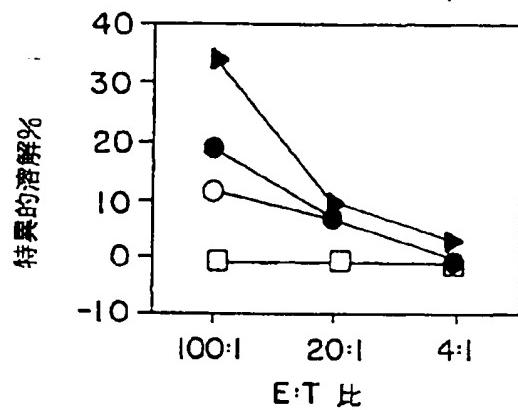
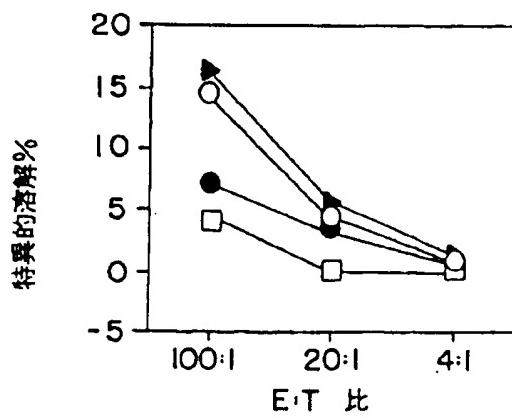


FIG. 3C



【図4】

FIG. 4A

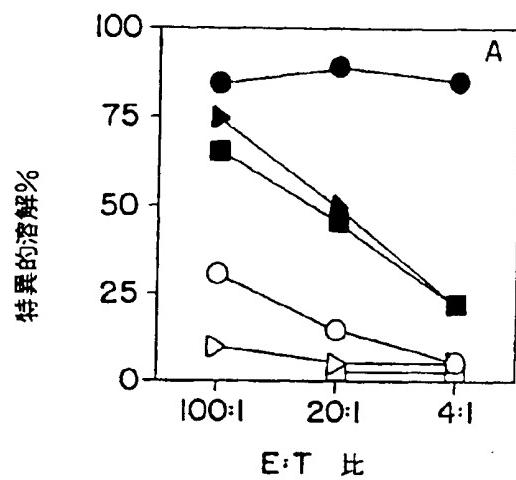
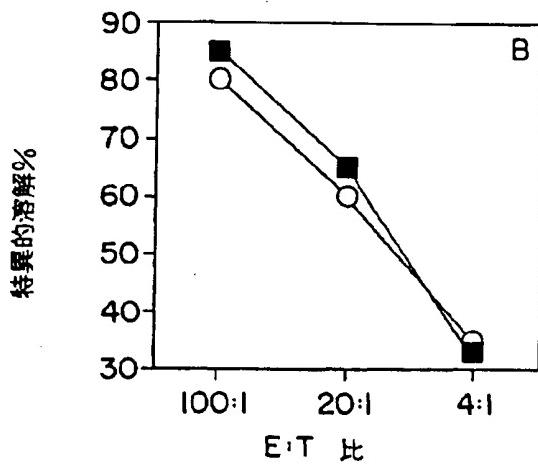
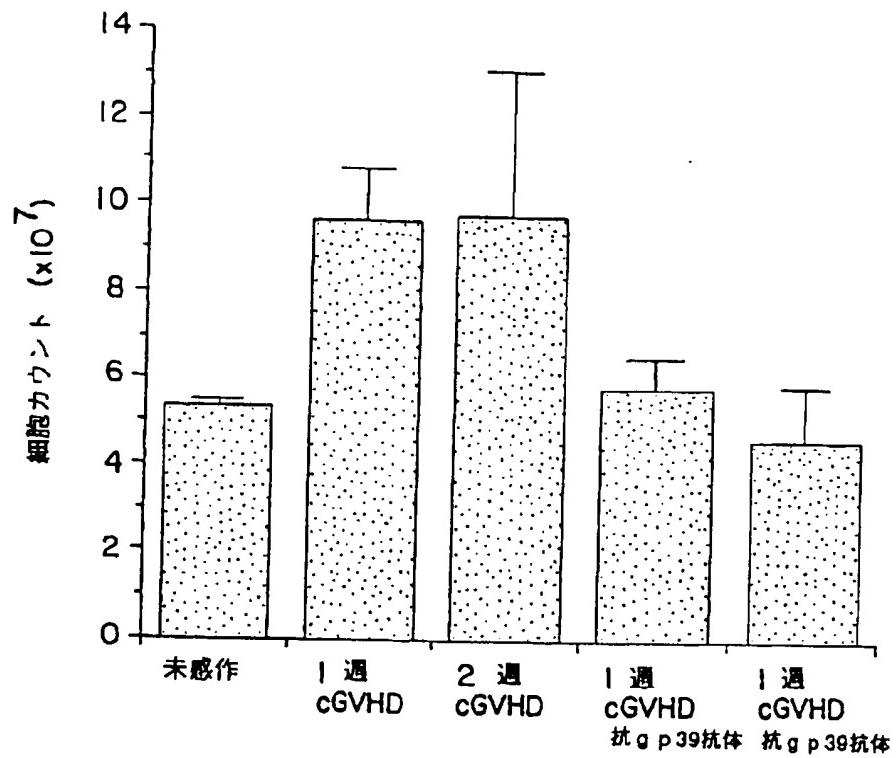


FIG. 4B



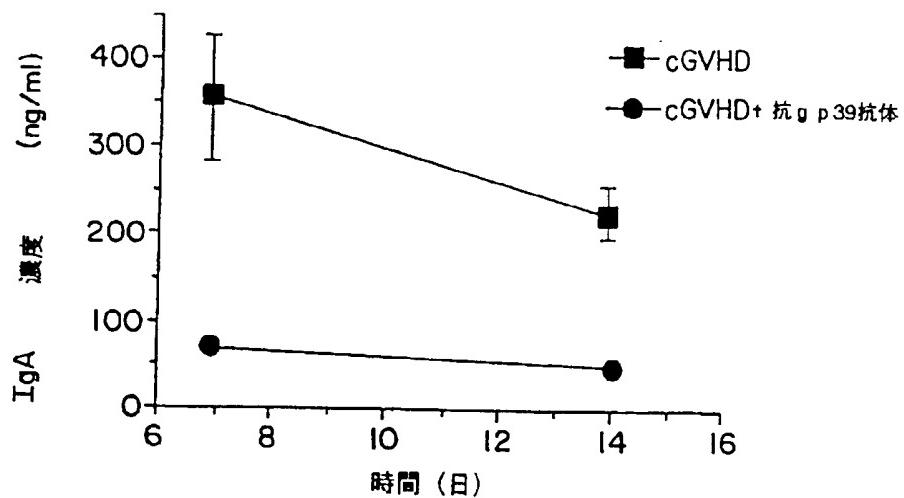
【図5】

FIG. 5



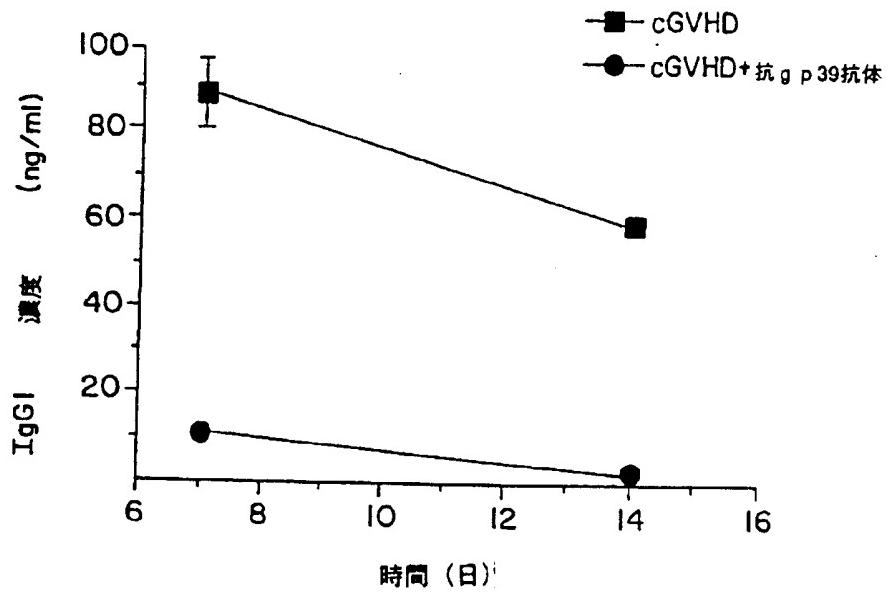
【図 6】

FIG. 6A



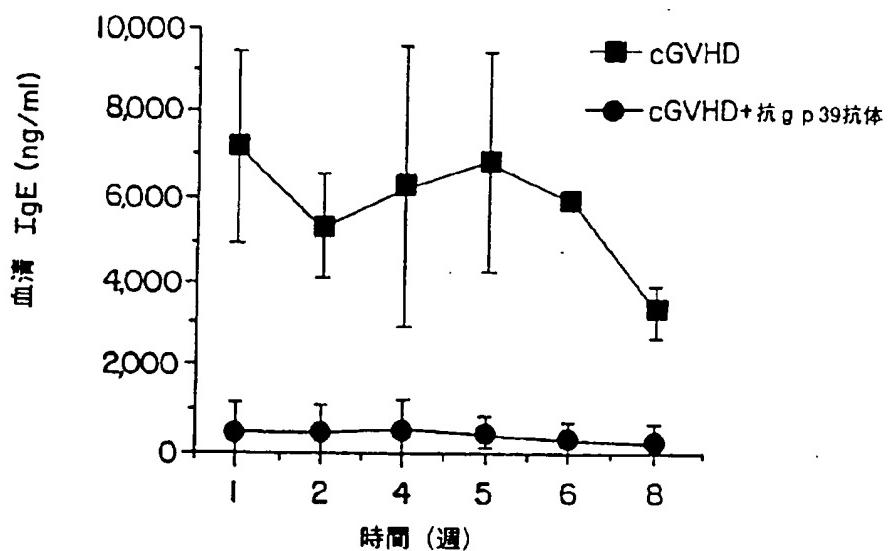
【図 6】

FIG. 6B



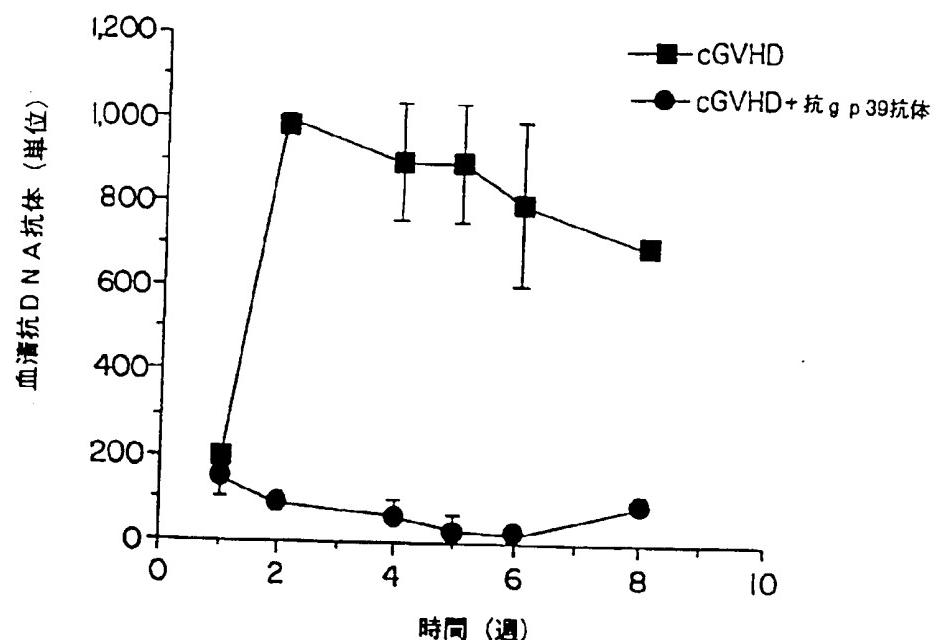
【図7】

FIG. 7A



【図7】

FIG. 7B



【図8】

FIG. 8A

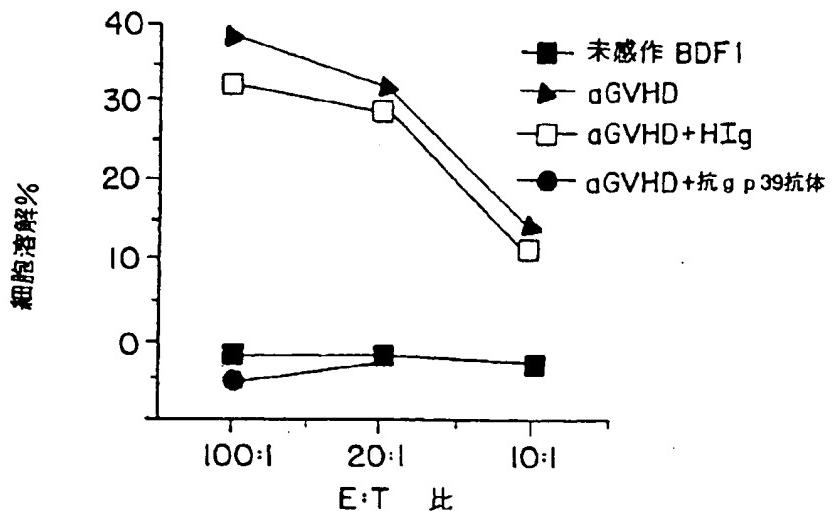
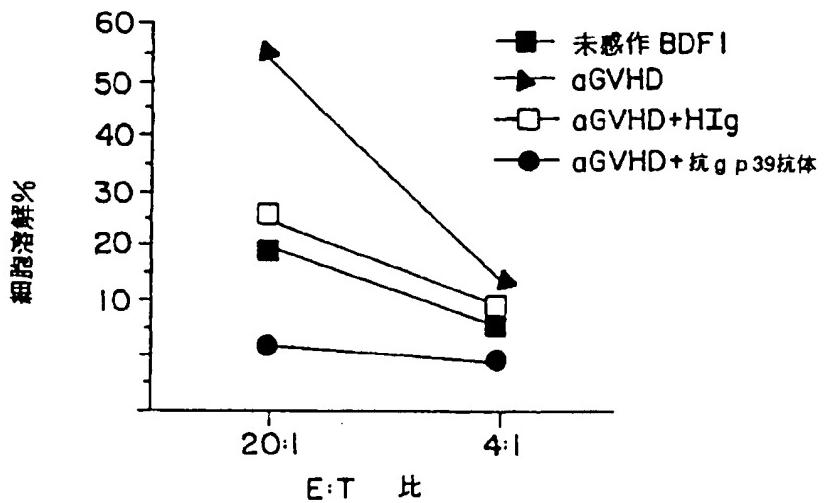


FIG. 8B



〔図9〕

FIG. 9A

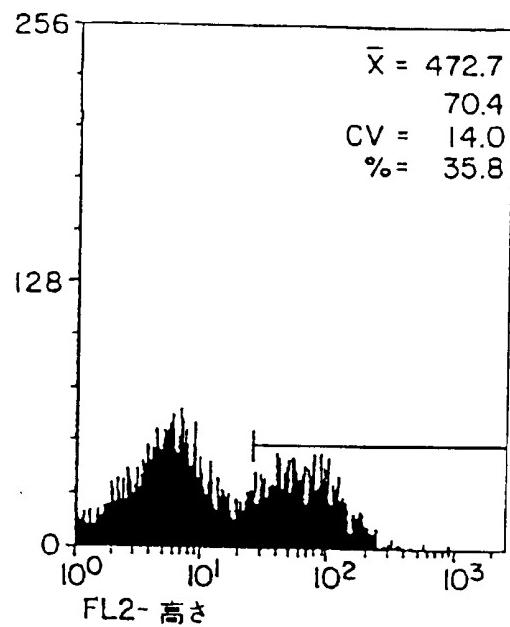
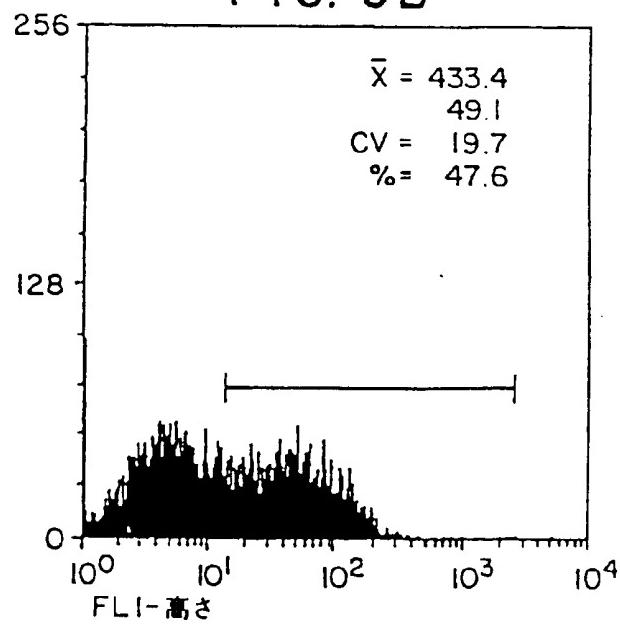
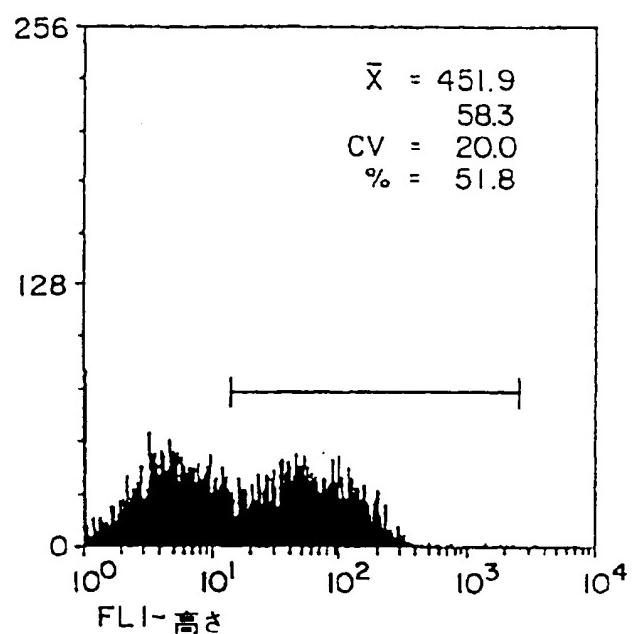


FIG. 9B



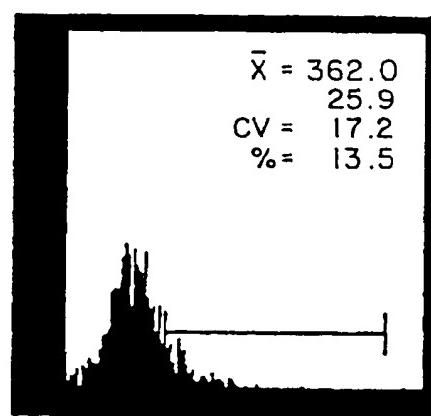
【図9】

FIG. 9C



【図10】

FIG. 10A



【図10】

FIG. 10B

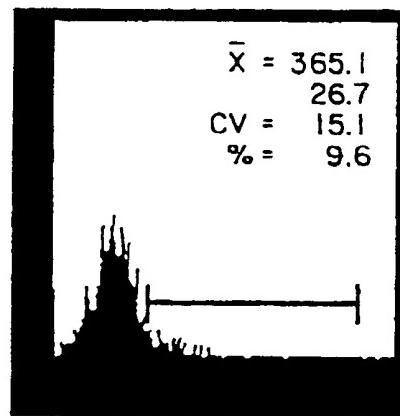
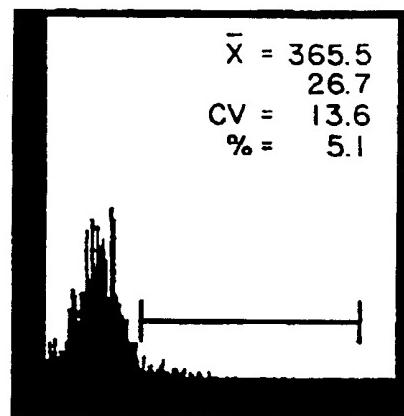


FIG. 10C



【図11】

FIG. II A

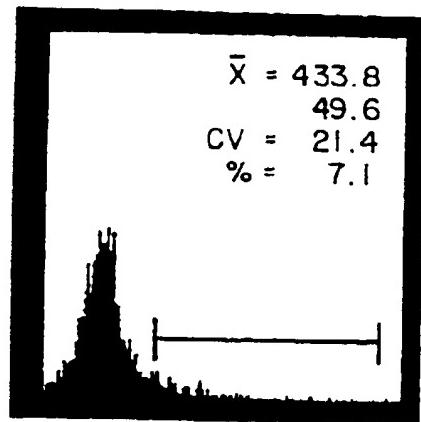
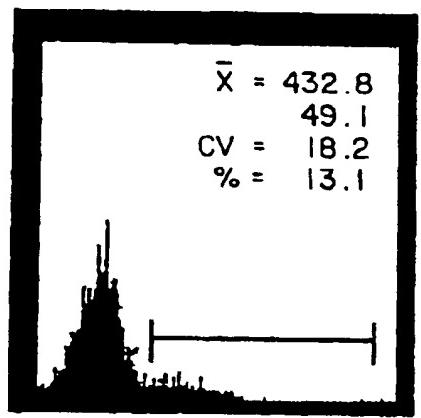
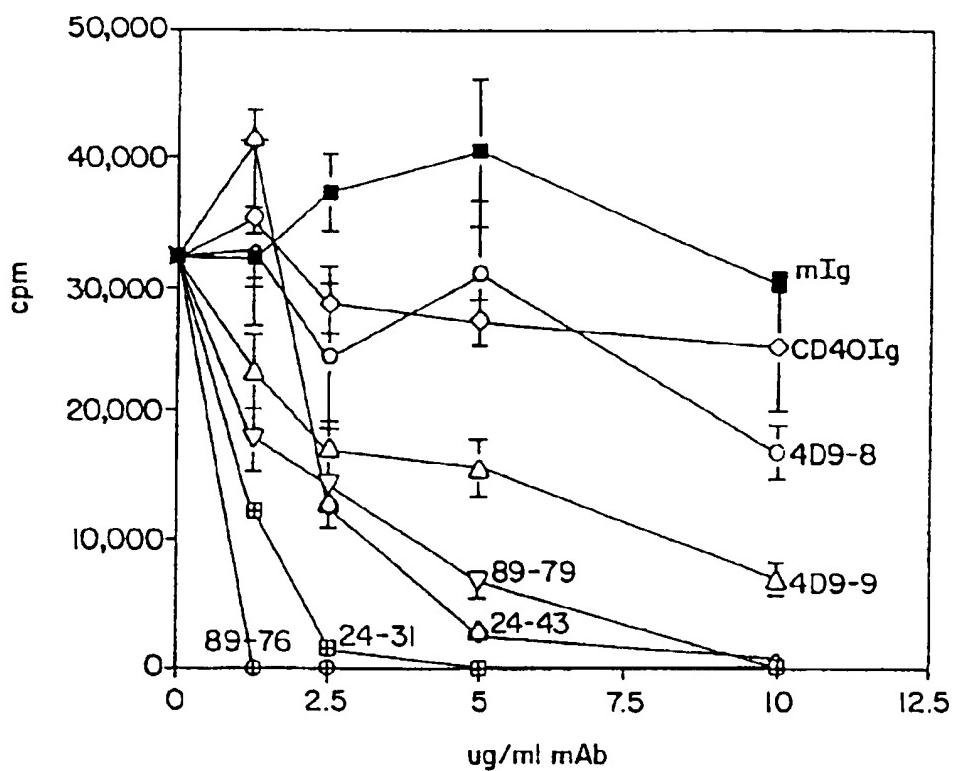


FIG. II B



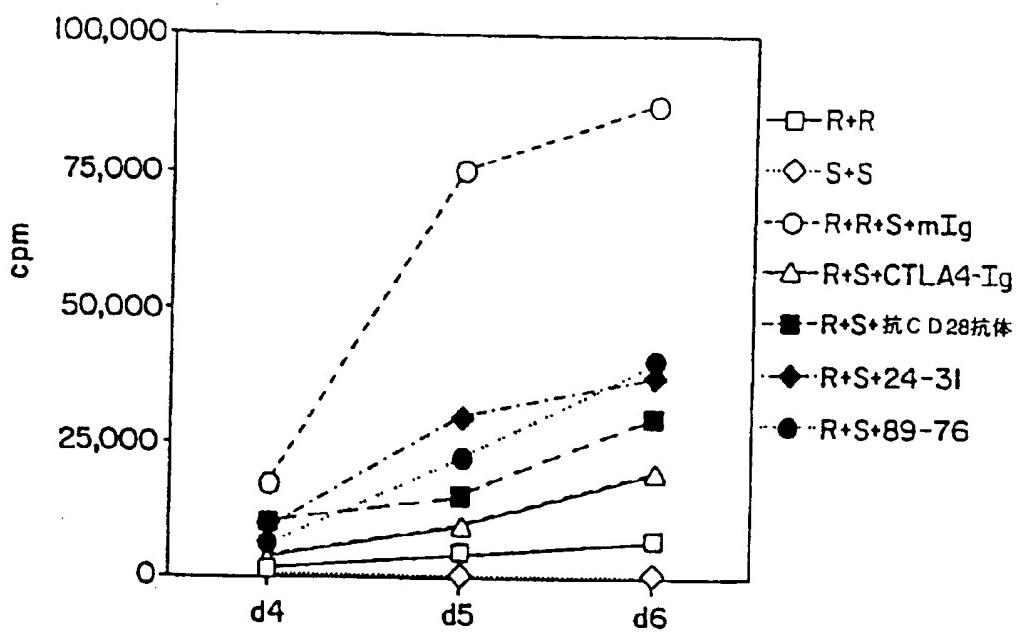
【図12】

FIG. 12



【図13】

FIG. 13



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 94/09953

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 A61K39/395 A61K38/17 A61K35/14 A61K35/28 //((A61K39/395, 35:14), (A61K39/395, 35:28), (A61K38/17, 35:14))													
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC													
B. FIELDS SEARCHED Maximum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 A61K													
Documentation searched other than maximum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched													
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>EP.A.0 555 880 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY ET AL.) 18 August 1993 see column 14, line 4 - column 20, line 41 see claims ---</td> <td>1-58</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.151, no.4, 15 August 1993, BALTIMORE MD, USA pages 1777 - 1788 B. CASTLE ET AL. 'Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes.' see abstract see page 1780, right column ---</td> <td>1-58</td> </tr> <tr> <td></td> <td>-/-</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Category	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	EP.A.0 555 880 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY ET AL.) 18 August 1993 see column 14, line 4 - column 20, line 41 see claims ---	1-58	A	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.151, no.4, 15 August 1993, BALTIMORE MD, USA pages 1777 - 1788 B. CASTLE ET AL. 'Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes.' see abstract see page 1780, right column ---	1-58		-/-	
Category	Description of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.											
A	EP.A.0 555 880 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY ET AL.) 18 August 1993 see column 14, line 4 - column 20, line 41 see claims ---	1-58											
A	THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.151, no.4, 15 August 1993, BALTIMORE MD, USA pages 1777 - 1788 B. CASTLE ET AL. 'Regulation of expression of the ligand for CD40 on T helper lymphocytes.' see abstract see page 1780, right column ---	1-58											
	-/-												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.													
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.													
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed													
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family													
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report												
13 December 1994	28.12.94												
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 8 Patentence 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: 31 451 490 6 Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nooitj, F												

Form PCT/ISA/218 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US 94/09953
--

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE IRRELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
A	JOURNAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, vol.13, no.3, May 1993, NEW YORK NY, USA pages 165 - 174 L. MARSHALL ET AL. 'The molecular basis for T cell help in humoral immunity: CD40 and its ligand, gp39.' see page 165, right column, line 8 - line 29; figure 1 see page 167, right column, line 17 - line 28 see page 168, right column, line 49 - page 169, left column, line 38 -----	1-58
A	IMMUNOLOGY TODAY, vol.13, no.11, November 1992, AMSTERDAM, THE NETHERLANDS pages 431 - 433 R. NOELLE ET AL. 'CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation.' see the whole document	1-58
P,A	THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol.178, no.5, 1 November 1993, NEW YORK NY, USA pages 1567 - 1575 T. FOY ET AL. 'In vivo CD40-gp39 interactions are essential for thymus-dependent humoral immunity. II. Prolonged suppression of the humoral immune response by an antibody to the ligand for CD40, gp39.' see abstract see page 1572, left column, line 8 - line 42 -----	1-58

Form PCT/ISA/218 (continuation of record sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 94/09953

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although all claims are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 94/09953

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0555880	18-08-93	AU-A-	3298893	19-08-93

Form PCT/ISA/218 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 E P (A T, B E, C H, D E,
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M
C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G
, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N,
T D, T G), A P (K E, M W, S D), A M, A T,
A U, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C
Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E, H U
, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L K, L R,
L T, L U, L V, M D, M G, M N, M W, N L, N
O, N Z, P L, P T, R O, R U, S D, S E, S I
, S K, T J, T T, U A, U S, U Z, V N

(72)発明者 デュリー, フィオナ・エイチ
アメリカ合衆国98107ワシントン、シアトル、ナンバー101、ノース・ウェスト・ブ
ィフティーエイス1731番

